

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Studium metabolismu inhibitorů tyrosinkinas,
protinádorových léčiv nové generace

Study of metabolism of tyrosin kinase inhibitors, anticancer drugs of
new generations

Diplomová práce

studijního oboru Biochemie

Bc. Vlastimil Hromek

Vedoucí závěrečné práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Rád bych poděkoval své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za vynikající a ukázkové vedení práce, a hlavně odborné rady a trpělivý přístup po celou dobu vypracovávání diplomové práce.

Dále děkuji Mgr. Radku Indrovi Ph.D. a dalším členům laboratoře za potřebnou pomoc a rady během práce v laboratoři. V neposlední řadě děkuji RNDr. Petru Pompachovi Ph.D. za provedení hmotnostní analýsy.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (grant 14-18344S)

OBSAH

ABSTRAKT.....	-6-
ABSTRACT.....	-7-
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	-8-
1. TEORETICKÝ ÚVOD.....	-10-
1.1. Rakovina.....	-10-
1.1.1 Třídění typů rakovin.....	-10-
1.1.2. Vznik nádorových procesů.....	-11-
1.1.3 Genové mutace vedoucí k rakovině.....	-12-
1.1.3.1 Onkogeny.....	-12-
1.1.3.2. Geny potlačující tvorbu nádorů.....	-13-
1.2 Léčba nádorových onemocnění.....	-13-
1.2.1 Využití operační léčby.....	-14-
1.2.2 Radioterapie v léčbě nádorových onemocnění.....	-14-
1.2.3 Chemoterapie.....	-14-
1.3 Typy chemoterapie a chemoterapeutik.....	-15-
1.3.1 Alkylační činidla.....	-15-
1.3.2 Platinové sloučeniny.....	-16-
1.3.3 Antimetabolity.....	-16-
1.3.4 Cytotoxická antibiotika.....	-18-
1.3.5 Biologická léčba.....	-18-
1.4. Inhibitory tyrosinkinas jako protinádorová léčiva.....	-19-
1.4.1 Proteinové tyrosinkinasy.....	-19-
1.4.1.1 Receptorové tyrosinkinasy.....	-19-
1.4.1.2 Nereceptorové tyrosinkinasy.....	-20-
1.4.2 Regulace funkce tyrosinkinas.....	-20-
1.4.3 Cíle inhibice tyrosinkinas.....	-22-
1.4.4 Druhy inhibitorů tyrosinkinas.....	-22-
1.4.4.1 Imatinib (Gleevec, STI571)	-22-
1.4.4.2 Vandetanib (ZD6474)	-23-
1.4.4.3 Cabozantinib (XL184)	-25-
1.5 Nádory štítné žlázy.....	-26-
1.5.1 Diferenciované rakoviny štítné žlázy.....	-26-

1.5.2 Medulární karcinom štítné žlázy (MTC – Medullar Thyroid Cancer).....	-27-
1.5.2.1 Signální cesta medulárního karcinomu štítné žlázy.....	-28-
1.5.3 Hurtleho karcinom.....	-28-
1.5.4 Anaplastický nádor štítné žlázy.....	-29-
1.6. Metabolismus léčiv.....	-29-
1.6.1 Cytochromy P450.....	-29-
1.6.2 Flavinové monooxygenasy.....	-31-
1.6.3 Peroxidasy.....	-32-
1.6.4 Konjugační enzymy.....	-32-
1.6.5 Metabolismus vandetanibu.....	-33-
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	-35-
3. MATERIÁL A METODY.....	-36-
3.1 Použitý materiál a chemikálie.....	-36-
3.2 Přístroje.....	-37-
3.3 Metody.....	-38-
3.3.1. Oxidace vandetanibu potkaními jaterními mikrosomy.....	-38-
3.3.2. Oxidace vandetanibu lidskými jaterními mikrosomy.....	-40-
3.3.3 Oxidace vandetanibu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech TM	-41-
3.3.4 Oxidace vandetanibu flavinovými monooxygenasami 4B	-42-
3.3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) sledující metabolismus vandetanibu.....	-44-
3.3.6. Identifikace metabolitů vandetanibu.....	-44-
4. VÝSLEDKY.....	-45-
4.1 Oxidace vandetanibu jaterními mikrosomy potkana.....	-45-
4.1.1 Separace metabolitů vandetanibu pomocí RP-HPLC.....	-45-
4.1.2 Identifikace metabolitů vandetanibu pomocí hmotnostní spektrometrie.....	-46-
4.1.3 Oxidace vandetanibu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných induktory CYP	-48-
4.2 Oxidace vandetanibu jaterními mikrosomy člověka.....	-50-
4.3 Oxidace vandetanibu potkaními rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech TM	-50-
4.4 Oxidace vandetanibu lidskými flavinmonooxygenasami.....	-53-
5. DISKUZE.....	-54-
6. ZÁVĚR.....	-57-
Seznam použité literatury.....	-59-

ABSTRAKT

Vandetanib je orální terapeutikum působící jako inhibitor tyrosinkinas. Specificky cílí na receptory signálních drah, jež jsou zodpovědné za vznik a proliferaci medulárního karcinomu štítné žlázy. Léčivo bylo v roce 2011 schváleno FDA (US Food and Drug Administration) pro léčbu symptomatického a progresivního medulárního karcinomu štítné žlázy u pacientů s neoperovatelnou lokálně pokročilou nebo metastázovanou rakovinou štítné žlázy. Nedávné studie naznačují, že jedním z problémů při léčbě pacientů vandetanibem je biotransformace tohoto xenobiotika v lidském organismu.

Diplomová práce rozšiřuje poznatky o metabolismu vandetanibu na jeho metabolity. V experimentech byly použity potkaní a lidské jaterní mikrosomy a lidské a potkaní cytochromy P450 (CYP) exprimované v SupersomechTM. Dále byly použity lidské flavinmonooxygenasy (FMO), exprimované v SupersomechTM. Použité potkaní mikrosomy byly izolovány z jater potkanů premedikovaných induktory jednotlivých forem cytochromů P450 nebo z jater nepremedikovaných zvířat (kontrolní mikrosomy). Pomocí HPLC byly metabolity separovány a následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Identifikované metabolity, tvořené oxidací vandetanibu potkaními mikrosomy, byly N-desmethylvandetanib a vandetanib N-oxid. Vandetanib N-oxid byl tvořen ve všech testovaných mikrosomech. N-desmethylvandetanib byl nalezen v největším množství v experimentech s mikrosomy potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrem (indukce CYP3A), v menším množství i v mikrosomech potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP2B/C) a mikrosomech nepremedikovaných potkanů. Z potkaních CYP byl tvořen N-desmethylvandetanib pouze CYP2C11. Z lidských cytochromů P450 byla detekována tvorba N-desmethylvandetanibu pouze v případě oxidace vandetanibu CYP3A4. Cytochrom b₅ výrazně stimuluje aktivitu CYP3A4. Za jeho přítomnosti dochází k významnému nárůstu tvorby N-desmethylvandetanibu. Z testovaných lidských flavinmonooxygenas (FMO) tvořil z vandetanibu jeho N-oxid v největší míře FMO1 a v menším množství i FMO3. FMO5 byl v oxidaci vandetanibu neúčinný.

Klíčová slova: inhibitory tyrosinkinas, vandetanib, xenobiotika, N-desmethylvandetanib, vandetanib N-oxid, cytochrom P450

ABSTRACT

Vandetanib is an oral anticancer drug, acting as tyrosinkinase inhibitor of a number of cell receptors. It targets to cell receptors, which are responsible for a development and proliferation of medullary thyroid cancer. This drug was approved by FDA (US Food and Drug Administration) for a treatment of late-stage (metastatic) or a progressive medullary thyroid cancer at patients who are ineligible for a surgery. Recent studies indicate that one of problems with the vandetanib therapy is its biotransformation in human organism.

This thesis investigates metabolism of vandetanib. Human and rat hepatic microsomes as well as rat and human cytochromes P450 (CYPs) and flavin monooxygenases expressed in SupersomesTM were used for this study. During experiments rat hepatic microsomes isolated from both the uninduced rats and animals in which individual CYPs expression was increased by CYP inducers were used. The metabolites formed from vandetanib were separated by HPLC and identified by mass spectrometry. The formed metabolites were identified as N-desmethylvandetanib and vandetanib N-oxide. Vandetanib N-oxide was generated by all tested microsomes. The highest amount of N-desmethylvandetanib was produced by microsomes of rats pretreated with pregnenolon carbonitrile (PCN that is an inducer of CYP3A). This metabolite was also generated in a low amount by microsomes of rats induced by phenobarbital (an inducer of CYP2B/C) and in microsomes of control (untreated) rats. From all tested human recombinant cytochromes P450, only CYP3A4 was able to produce N-desmethylvandetanib. Of the tested rat recombinant CYPs, only CYP2C11 was able to generate this metabolite. If CYP3A4 was expressed in SupersomesTM together with cytochrome b₅, a significant increased amount of N-desmethylvandetanib was detected. In the case of the flavin monooxygenase 1 (FMO1), this enzyme produced the highest amount of vandetanib N-oxide. Flavin monooxygenase 3 (FMO3) was much less effective in oxidation of vandetanib to this metabolite than FMO1, whereas FMO5 was ineffective in this reaction.

Keywords: tyrosine kinase inhibitors, xenobiotics, vandetanib, N-desmethylvandetanib, vandetanib N-oxide, cytochrome P450

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ARG	"ABL-related gene"
ATP	adenosintrifosfát
Blk	B lymfoidní tyrosinkinasa
BRC- ABL	"breakpoint cluster region protein - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1"
BRCA1	"breast cancer 1, early onset"
BRCA2	"breast cancer 2, early onset"
CML	chronická myeloidní leukemie
CMML	chronická myelomonocytární leukémie
CPR	cytochrom P450 reduktáza
Csk	c-src tyrosinkinasa
CYP	cytochrom P450
cyt b₅	cytochromem b ₅
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	epidermální receptorový růstový faktor
ESI	electrospray ionization
EtOH	ethanol
F-dUMP	fluorodeoxymonofosfát
FDA	"US Food and Drug Administration"
Fgr	"Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog"
FGFR	receptory fibroblastového růstového faktoru
FLT3	"fms-like tyrosine kinase 3"
FMO1	flavinový monooxygenasový systém 1
FMO3	flavinový monooxygenasový systém 3
FUTP	fluoridintrifosfát
FMTC	familiární medulární karcinom štítné žlázy
FTMS	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
FUMP	fluorouridinmonofosfát
GDNF	"glial cell line-derived neurotrophic factor"
GS	NADPH-generující systém

HER-2/neu	"human epidermal growth factor receptor-2"
HPLC	high-performance liquid chromatography
Hsp90	"heat-shock protein 90"
KIT	"mast/stem cell growth factor receptor"
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MEN 2	mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2
MET	receptory hepatocytárního růstového faktoru
MFO systém	"mixed function oxidases" systém
MS	mikrosomální systém
MTC	medulární thyroideální karcinom
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
nRTK	nereceptorová tyrosinkinasa
ORR	míra objektivní odpovědi
PB	fenobarbital
PCN	pregnenolonkarbonitril
PDGF	"platelet-derived growth factor"
PI3K	fosfatidylinositol-3'-kinasa
PFS	období přežití bez progresu
PK	proteinkinasa
pp^{60c-src}	proto-onkogen protein 60 c-src
RB1	"retinoblastoma 1"
RET	"rearranged during transfection"
RP-HPLC	reverse phase - high-performance liquid chromatography
RPM	otáčky za minutu
RTK	receptorová tyrosinkinasa
TC	rakovina štítné žlázy
TK	tyrosinkinasa
TKI	tyrosinkinasový inhibitor
TP53	tumor supresorový gen p53
TSH	hormon stimulující štítnou žlázu
Tyr-527	tyrosin 527
VEGFR	receptor cévního endoteliálního růstového faktoru

1. Teoretický úvod:

1.1 RAKOVINA

Rakovinné onemocnění se vyznačuje abnormálním růstem buněk, způsobeným větším množstvím změn v genové expresi. Tento proces následně vede k narušení regulace buněčné proliferace a apoptózy. Následkem těchto změn může vznikat větší množství buněk, jež jsou invazivní vůči okolní tkáni a metastázuji do vzdálenějších částí organismu. Právě invazivnost nádorů a jejich metastázování do vzdálených tkání jsou ve většině případů zodpovědné za celkové zhoršení stavu pacienta, a pokud není zahájena vhodná léčba, i za jeho smrt. [Ruddon, 2007]

K 1. červenci 2015 mělo za život diagnostikovanou rakovinu téměř 14,5 milionů žijících pacientů v USA, a to ať již delší dobu vyléčených, nebo stále léčených. Za rok 2015 byla rakovina v USA diagnostikována téměř 1,7 miliónu nových pacientů, z čeho se předpokládá, že jich 589 430 v USA v daném roce zemře. Procentuálně se však šance pacientů, že přežijí více než 5 let, výrazně zvýšily. Pacienti diagnostikovaní mezi roky 2004-2010 měli šanci na uzdravení 68%, zatímco v letech 1975-1977 to bylo pouze 49%. Za výrazné zvýšení šance na uzdravení pacientů může hlavně včasná diagnóza a velké pokroky v léčbě nádorových onemocnění. [Siegel et al, 2016]

1.1.1 Třídění typů rakovin

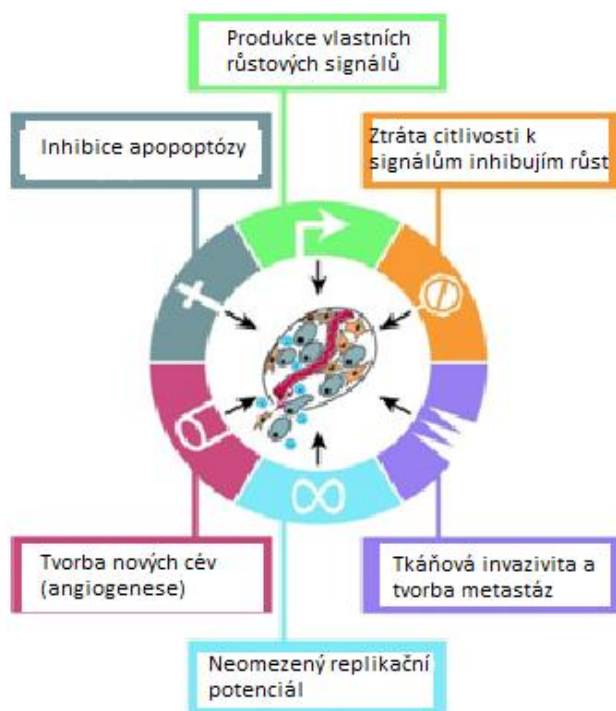
Rakovinu lze rozdělit do mnoha kategorií, nejběžnější je ale dělení dle jejího vzniku:

- **Karcinom (Carcinoma)** – rakovina vznikající z buněk epiteliální tkáně, mezi tento typ nádorů se řadí většina nádorů prostaty, prsou, plic, a slinivky [Janice, 2007]
- **Sarkom (Sarcoma)**- rakovina, která se nejdříve vyvíjí z pojivové tkáně. Příkladem tkání, ze kterých sarkomy vznikají, je tkáň kostní, chrupavčitá, tuková, svalová a jiné spojovací nebo podpůrné tkáně. [Janice, 2007]

- **Leukemie a Lymfom (Leukemia and Lymphoma)**- tyto typy rakovin jsou iniciovány v krvetvorné tkáni jako je kostní dřeň. Následkem dochází k produkci abnormálních krevních tělísek, které pak vstupují do krve [National Cancer Institute, 2016]. Leukemie je nejčastějším typem rakoviny u dětí (okolo 30% dětských nádorů) [Varricchio, 2004]
- **Nádory vznikající ze zárodečných buněk (Germ cell tumor)** - do této skupiny se řadí nádory vznikající z pluripotentních buněk. Nejznámější z této skupiny nádorů je rakovina varlat a vaječníků [Janice, 2007]

1.1.2. Vznik nádorových procesů

Dnes je již obecně přijímaná teorie, že vývoj rakoviny je vícekrokový proces. Každý krok odráží změnu genetické informace, jež vede ke změně zdravé buňky v nádorovou buňku. Je možné tento proces rozdělit do šesti hlavních kroků (obrázek č.1). Součet těchto kroků je zodpovědný za vznik malignit. Prvním krokem je nepotřeba růstových signálů k proliferaci buňky. Mnoho nádorových buněk získá schopnost vytvářet vlastní růstové signály, na které opět samy odpovídají. Dalším krokem je ztráta citlivosti buňky k inhibičním signálům. Jakmile dojde ke ztrátě citlivosti k signálům zabraňujícím nekontrolovanému růstu buněk, dojde k proliferaci mutované buňky. Třetím krokem je zabránění buňce v apoptóze. Tento krok je esenciální, jelikož je přítomen téměř ve všech druzích nádorových buněk. Následujícím krokem je získání nekonečného replikačního potenciálu díky chybě v regulaci enzymu telomerasy. U zdravých buněk je běžné, že buňka dosáhne maximálně 70 replikací, načež buňka „spáchá naprogramovanou smrt“. Pátým krokem je angiogeneze (tvorba nových cév), jež jsou zodpovědné za dodávání kyslíku a živin nádoru. Finálním krokem, zodpovědným za většinu umrtí na rakovinu, je její invazivita nádoru do okolních tkání a tvorba metastáz. [Hanahan a Weinberg, 2000]



Obrázek č. 1 – Šest kroků zodpovědných za vývoj a přežití nádoru [Hanahan a Weinberg, 2000] *upraveno*

1.1.3 Genové mutace vedoucí k rakovině

Geny, hrající roli ve vývoji rakoviny, se dají rozdělit zejména do tří hlavních skupin. Geny aktivující buněčnou proliferaci (onkogeny), tumor supresorové geny, zodpovědné zejména za inhibici proliferace a v poslední řadě geny účastníci se oprav DNA. [Chanda et al, 2006)]

1.1.3.1 Onkogeny

Onkogeny byly první identifikované geny, u nichž bylo zjištěno, že jsou zodpovědné za proliferaci buňky [Ponder, 2001]. Velká část onkogenů vzniká mutací určitého normálního genu, označovaného jako protoonkogen. Protoonkogeny jsou za normálního stavu zodpovědné za proliferaci buněk. Mutací protoonkogenů může dojít k jejich transformaci na onkogeny, způsobující nekontrolovanou proliferaci a diferenciaci buněk [Varmus, 1985]. Mezi onkogeny patří například geny *ras*, *myc*, *abl*, *fos* a *jun*. Většina nádorových procesů není zapříčiněna zděděnými mutacemi protoonkogenů, ale jsou získány v průběhu života jedince. Obecně jsou onkogeny aktivované bodovými mutacemi, záměnami a translokacemi na

chromosomech, či amplifikacemi jistého genu. [Harris, 1991]. Příkladem přeskupení na chromosomech je vznik genů označovaných jako BCR-ABL („breakpoint cluster region protein - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“), jejichž následkem dochází k vývoji chronické myeloidní leukemie (CML) [Artigas et al, 2002]

1.1.3.2 Geny potlačující tvorbu nádorů

Tumor supresorové geny jsou normální geny, jež bývají označovány jako anti-onkogeny. Jejich hlavní funkcí je zpomalení buněčného dělení, opravování chyb v DNA nebo iniciace apoptózy u buněk. V případě nefunkčnosti těchto genů může docházet u buněk ke ztrátě schopnosti buněk regulovat proliferaci, což vyústí v jejich nekontrolované dělení. Tyto supresorové geny jsou tedy inaktivovány mutací, jež zabrání jejich další funkci [Ponder, 2001]. V současnosti je již známo mnoho genů se schopností potlačovat proliferaci, mezi nejznámější patří TP53 (p53), BRCA1 („breast cancer 1, early onset“), BRCA2 („breast cancer 2, early onset“) a RB1 („retinoblastoma 1“). [Ruddon, 2007]. Pravděpodobně nejdůležitějším zástupcem tumor supresorových genů je gen TP53 (tumor supresorový gen 53), kódující protein p53. Mutací vzniklý protein byl nalezen ve více než polovině všech nádorových onemocnění postihujících lidskou populaci. Příkladem nádorů, ve kterých byl p53 nalezen, je rakovina plic, tlustého střeva, prsu etc. Dominantní role p53 je způsobena zejména tím, že hraje důležitou roli v signalizaci apoptózy. Při poškození proteinu tedy „nespouští“ u buněk s poškozenou DNA buněčnou smrt, ale buňky mohou pokračovat v růstu a proliferaci [Vogelstein et al, 2000; Olivier et al, 2003]

1.2. LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Léčba nádorových onemocnění je komplexní problém, proto dochází k využití různých druhů léčby. Vhodnost léčby se posuzuje na základě zdravotního stavu pacienta, typu nádorového onemocnění a jeho stádia. Často se kombinují různé druhy léčby, aby se při léčbě rakoviny dosáhlo vyšší úspěšnosti. [Sudhakar, 2009]

1.2.1 Využití operační léčby

Vyoperování nádoru patří mezi vůbec první druh léčby, který byl využíván při léčbě nádorů již od starověku. Operační léčba je však pouze lokální léčbou a proto ji lze využít pouze u nádorů, které se ještě nerozšířily do okolních částí těla krevním řečištěm (nemetastázovaly). Při operačním vyjmutí nádoru se také obvykle odstraňuje zdravá tkáň v okolí nádoru a lymfatické žlázy v blízkosti. Tato léčba je však často doplněná radioterapií, chemoterapií, nebo kombinací obou. [Sudhakar, 2009]

1.2.2 Radioterapie v léčbě nádorových onemocnění

Radioterapie patří mezi klasické druhy léčby nádorů. Jak samotná, tak v kombinaci s jinými druhy léčby (chemoterapie, chirurgické odstranění nádoru), je využívána u více než 60% léčených pacientů s nádorovým onemocněním. Radioléčba rakoviny využívá k léčbě ionizující záření. Cílem léčby je zničit nebo inaktivovat nádorové buňky a zachovat zdravé buňky. Dochází k využití rentgenového záření nebo částic, jež způsobí ionizaci uvnitř buňky. V zásadě při využití radioterapie dochází ke dvěma přístupům. Prvním přístupem je externí radioterapie, využívající při léčbě pacientů elektromagnetické záření. Lineární akcelerátor generuje vysokoenergetické záření, které je soustředěno do oblasti výskytu nádorových buněk. [Dunne-Daly, 1999]

Druhým přístupem je interní radioterapie, neboli brachyterapie. Interní radioterapie je léčba, jež využívá radioaktivního materiálu, vkládaného přímo do těla pacienta. Tato léčba je hojně využívána například při léčbě diferenciovaného karcinomu štítné žlázy. Během terapie dochází k podávání ¹³¹I-jodidu draselného nebo sodného (¹³¹I). Ten je vychytán zbývajícími metastázami, jež nemohly být chirurgicky odstraněny. Podmínkou úspěšné léčby radiojódem je schopnost nádoru vychytávat jód z těla pacienta. [Luster et al, 2008]

1.2.3 Chemoterapie

Termín chemoterapie znamená využití jakéhokoli léku pro léčbu jakéhokoli onemocnění. Avšak ve spojení s nádorovými onemocněními se pod tímto pojmem uvažuje léčba nádorového onemocnění pomocí léků. Jinak bývá také označována jako aneoplastická terapie nebo cytotoxická chemoterapie. Chemoterapie se odlišuje od ostatních druhů léčby tím, že až na nejnovější druhy léčiv dochází k léčbě rakoviny v celém organismu. K dnešnímu

dni je využíváno velké množství chemoterapeutik, a to jak při samostatném využití, tak v kombinaci s využitím jiného druhu léčby. [Peterson et al, 2012]

1.3 TYPY CHEMOTERAPIE A CHEMOTERAPEUTIK

Léčba rakoviny se většinou skládá z operativního odstranění nádorů, radioterapie a následné chemoterapie. Chemoterapie je ve většině případů využita jako systémová léčba, což platí obzvláště v případech, kdy došlo k uvolnění metastáz nádorem do krevního oběhu. Veškerá cytostatika fungují na bázi rozrušení jednoho nebo více kroků v buněčném cyklu. Chemoterapeutika způsobují buněčnou smrt jak interakcí s DNA nádorové buňky, tak zacílením klíčových proteinů pro dělení buňky. Z těchto informací ovšem také vyplývá, že jejich vedlejším efektem bude poškození i zdravých buněk. Proto je tedy nutné vždy vyvažovat mezi poškozováním nádorových buněk a zachováním zdravých buněk. [Fernando a Jones, 2015] V tomto přehledu probereme pouze základní léčiva s důrazem na typy chemoterapeutik využívaných při léčbě karcinomů štítné žlázy.

1.3.1 Alkylační činidla

Alkylační činidla jsou elektrofilní sloučeniny reagující s nukleofilními centry v molekulách DNA. Jejich účinek spočívá v kovalentní modifikaci DNA, jež vyústí následně v poškození struktury a funkce DNA. Častý je vznik jedno- nebo dvojřetězových zlomů DNA. Takové poškození DNA zabrání nádorové buňce v další replikaci. Tato skupina léčiv se nezacílí pouze na určitou část buněčného cyklu nádoru. Do této třídy chemoterapeutik se řadí například sloučeniny, odvozené od tris(2-chlorethyl)aminu, deriváty nitrosomočoviny a triazeny. [Puyo et al, 2014; Rang et al, 2007]

Mezi první alkylační činidla se řadí sloučeniny odvozené od tris(2-chlorethyl)aminu, jinak nazývané "dusíkaté yperity". Tato skupina léčiv je odvozena od bojového plynu yperitu, jež byl využíván ve druhé světové válce. [Papac, 2001] Avšak v dnešní době se již methchlortethamin, nejvíce připomínající původní sloučeninu, z důvodu vysoké toxicity již téměř nevyužívá. Využívaným léčivem ze skupiny dusíkatých yperitů je například chlorambucin při léčbě Hodgkina lymfomu a chronické lymfopatické leukemie. [Lind, 2008]

Do podtřídy derivátů nitrosomočoviny se řadí například karmustin, lomustin, semustin, fotemustin a streptozotocin. Mechanismem účinku derivátů nitrosomočoviny je alkylace DNA chlorethyl diazoniovými ionty a karbamylace proteinů isokyanáty, jež vznikly rozkladem léčiva ve vodném prostředí.

Podtřidu triazenů tvoří léčiva, uvolňující diazóniový ion, který se alkyluje na DNA. Řadí se mezi ně například dikarbazín, využívaný při léčbě maligního melanomu, Hodgkinovy choroby a temozolomid na léčbu maligního melanomu a gliomu. Mezi podskupinami využívaných alkylačních činidel jsou například prokarbaziny, hexamethylmelaminy a arizidiny. [Lind, 2008]

1.3.2 Platinové sloučeniny

Mezi hojně využívanou třídu chemoterapeutik patří v dnešní době platinové sloučeniny. Reagují analogickým mechanismem jako alkylační činidla, tedy přes reaktivní intermediát, jež se kovalentně váže na nukleotidy DNA. Tento mechanismus opět vyústí v zesílení vláken DNA. Mezi hlavní zástupce těchto činidel odvozených od kovů, se řadí cisplatina, carboplatina a oxaplatina (1,2-diaminocyklohexan platina). Cisplatina byla objevena již v roce 1969, avšak klinicky byla využita až o deset let později. Nástupcem této sloučeniny byla karboplatina, jež se projevuje nižší reaktivitou než její předchůdce, což však snižuje i její neurotoxické a nefrotoxické vedlejší účinky. Oxoplatina oproti svým předchůdcům má navíc 1,2-diaminocyklohexanový kruh, který zaplňuje „velký žlábek“ DNA. Mechanismus působení oxoplatiny zamezuje následným opravám poškozené DNA nádorovými buňkami, čímž se vysvětluje odpověď na léčbu u nádorů, jež na předchozí dva analogy platiny nereagovaly. [Lippert, 1999; Lind, 2008]

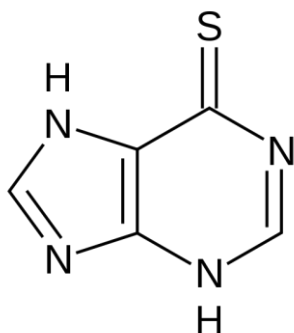
1.3.3 Antimetabolity

Do třídy antimetabolitů se řadí cytotoxická činidla, imitující přirozeně se vyskytující metabolity, jakými jsou například puriny a pyrimidiny. Prvním z mechanismů působení těchto léčiv je inhibice klíčových enzymů v syntéze DNA či RNA. Druhým mechanismem působení je interkalace se léčiva do DNA při její syntéze DNA-polymerázou, což vyústí v předčasné zakončení syntézy DNA. Tento druh cytotoxických činidel působí převážně v S fázi buněčného cyklu. [Weinberg, 2013]

Antifoláty je skupina antimetabolitů, jež po transportu do buňky inhibují reduktasu kyseliny dihydrolistové. Kyselina dihydrolistová je v organismu zodpovědná za regeneraci oxidovaných folátů následnou syntézou thymidinu. Následkem této inhibice je tvorba folátových shluků a snížení syntézy thymidinu. Typickým zástupcem antifolátů je methotrexát, jež imituje kyselinu listovou. [Lind, 2008]

Další velkou podkupinou jsou antipyrimidinové léky, interferující se syntézou pyrimidinů. Zde je nejtypičtějším zástupcem 5-fluorouracil, inhibující thymidylásynthasu. 5-fluorouracil je metabolizován vnitrobuněčnou kaskádou reakcí přes fluorouridinmonofosfát (FUMP) na fluoridintrifosfát (FUTP) a fluordeoxymonofosfát (F-dUMP). Prvním z konečných inhibitorů je tedy fluoridintrifosfát, začleňovaný do RNA a narušující její funkci. Druhým vzniklým inhibitorem je fluordeoxymonofosfát, který se váže kovalentně na thymidylásynthasu a jeho kofaktor 5,10-methylenetetrahydrofolát, za vzniku ternárního komplexu. Tento komplex inhibuje syntézu thymidinu *de novo*, čímž i syntézu DNA. Problém 5-fluorouracilu je jeho špatná biologická dostupnost. Dalšími zástupci antipyrimidinů jsou například arabinozidy, inhibující DNA polymerasu a interkalací do DNA, či gemcitabin s obdobným mechanismem působení. [Lind, 2008]

Mezi antipuriny se řadí hlavně 6-merkaptopurin (obrázek č. 2) a 6-thioguanin. Obě intracelulární formy těchto antimetabolitů jsou začleňovány purinovou syntézou *de novo* do DNA. [Lind, 2008]

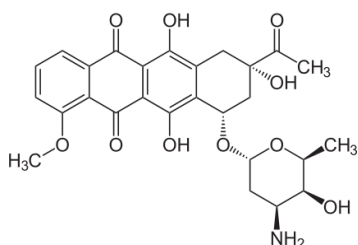


Obrázek č. 2-Strukturní vzorce 6-merkaptopurinu

[<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mercaptopurine.svg> (přístup 1.4.2014)]

1.3.4 Cytotoxická antibiotika

Do třídy cytotoxických antibiotik se řadí převážně sloučeniny, získané z přírodních zdrojů, jakými jsou například bakterie. Mechanismem jejich účinku je buď jejich interkalace do DNA, tvorba zlomů v DNA, inhibice topoisomerasy II nebo tvorba volných radikálů, způsobujících oxidační stres v nádorové buňce. Řadíme sem antracykliny, jež jsou produkovány například pomocí bakterií *Streptomyces spp.* Vůbec prvními antracykliny byly daunorubicin (obrázek č. 3) a doxorubicin. Léčivo využívané na léčbu rakoviny prsu, vaječníků a prostaty [Lind, 2008; Weinberg, 2013]



Obrázek č. 3-Strukturní vzorec daunorubicinu

[<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Daunorubicin.svg> (přístup 21.3.2016)]

1.3.5 Biologická léčba

S pokrokem znalostí o nádorových onemocněních se zjišťuje, že velká část nádorových procesů je způsobena chybnou regulací některé ze signálních drah buňky. Následkem dané poruchy v regulaci může dojít k abnormalitám jako je buněčné dělení a inhibice apoptózy. Tyto abnormality mohou vyústit v nádorové bujení. Inhibice proteinkinasy spočívá ve využití malých organických molekul, zaměřujících se na proteinkinasy. Inhibice proteinkinasy ve výsledku inhibuje celou signální dráhu. Jako slibná strategie se ukazuje inhibice obzvláště tyrosinkinasy. Mezi jiné inhibované proteinkinasy patří například Serin/Threonin kinasy, proteinkinasy fosforylující zbytky serinu či treoninu v "zacílených" proteinech. [Shchemelinin et al, 2006; Levitzki, 2013]

1.4. INHIBITORY TYROSINKINAS JAKO PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA

Využití inhibitorů proteinkinas, obzvláště pak tyrosinkinasových inhibitorů, bylo při léčbě nádorových onemocnění dlouhou dobu opomíjeno. Velkým průlomem biologické léčby bylo úspěšné využití léčiva imatinibu inhibitoru BCR-ABL-tyrosinkinas („breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“) při léčbě chronické myeloidní leukemie (CML). Velký úspěch léčiva změnil názor společnosti na „zacílenou léčbu“ a umožnil vývoj nových druhů inhibitorů proteinkinas. [Krause a Van Etten, 2005; Druker et al, 2006]

1.4.1 Proteinové tyrosinkinasy

Proteinové tyrosinkinasy jsou enzymy katalyzující přenos fosfátu z ATP na tyrosylové zbytky v polypeptidech. V lidském genomu bylo již objeveno přes 90 tyrosinkinas a 43 genů podobných tyrosinkinasám. Transkripce těchto genů vznikají proteiny signálních drah. Tyrosinkinasy jsou zodpovědné za buněčnou proliferaci, diferenciaci a jiné esenciální procesy každé buňky. Proteinové tyrosinkinasy dělíme do dvou hlavních skupin, z nichž první je tvořena receptorovými tyrosinkinasami (RTK) a druhá nereceptorovými tyrosinkinasami (nRTK). [Krause a Van Etten, 2005]

1.4.1.1 Receptorové tyrosinkinasy

Tyto allosterické enzymy mají kinasovou aktivitu a vyznačují se přítomností „ligand-vázající“ extracelulární domény. Doména reaguje na přítomnost ligandu a napojuje se prostřednictvím krátké hydrofóbní domény, procházející buněčnou membránou, na intracelulární doménu. Katalytickou aktivitu má však pouze intracelulární doména. K aktivaci receptoru dojde po vazbě ligandu, jakým je nejčastěji specifický růstový faktor. Ligand navázaný na extracelulární doménu, způsobí konformační změnu tyrosinkinasy, což vyústí v dimerizaci tyrosinkinas. Dimerizací dvou tyrosinkinas dojde ke vzájemné autofosforylaci obou vazebných monomerů. Následkem fosforylace zbytků tyrosinů dochází v intracelulární doméně ke vzniku nových vazebných míst. Nově vzniklá vazebná místa umožňují navázání dalších různých intracelulárních proteinů s SH-2 doménou, spouštějící signální kaskádu. Příkladem proteinů využívajících tuto signalizační dráhu jsou Ras-proteiny [Rosypal, 1999].

1.4.1.2 Nereceptorové tyrosinkinasy

Tyrosinkinasy, které nemají extracelulární ani transmembránovou doménu, se nazývají nereceptorové tyrosinkinasy. Délka jejich polypeptidového řetězce jejich kinasové domény je zhruba 300 aminokyselin a vyznačuje se stabilní sekvencí u všech nereceptorových tyrosinkinas. Kinasová doména se vyznačuje enzymovou aktivitou. Příkladem nRTK je Src-rodina, do které se řadí například Blk (B lymfoidní tyrosinkinasy), Csk (c-src tyrosinkinasa), Src, Fgr („Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog“) a mnohé další tyrosinkinasy. Každá z těchto nereceptorových tyrosinkinas obsahuje domény SH1, SH2 a SH3. Stejně jako u RTK, po fosforylaci tyrosylových zbytků dochází ke spuštění signální kaskády. Prototypem této rodiny je nereceptorová tyrosinkinasa pp 60^{c-src} (proto-onkogen protein 60 c-src), kódovaná genem c-src. Tyrosin 527 domény SH-1 zde slouží jako místo pro regulaci autoinhibice. V případě, že je tento tyrosylový zbytek fosforylován, dojde k blokaci aktivního místa kinasy. Naopak, pokud je Tyr-527 nefosforylovaný, nedojde k blokaci aktivního místa, a může za určitých podmínek po vazbě růstového faktoru dojít ke spuštění signální kaskády. [Rosypal, 1999]

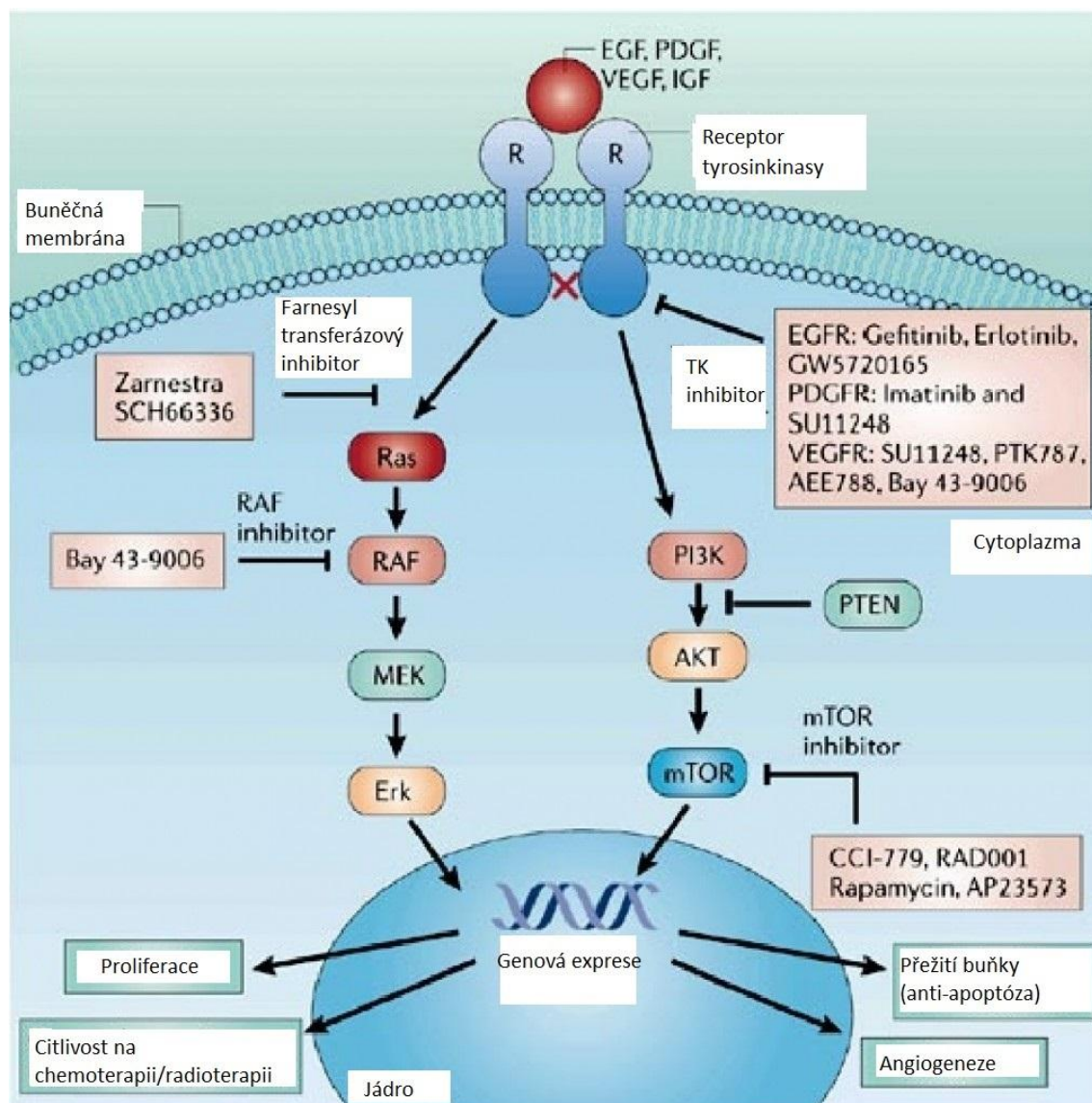
1.4.2 Regulace funkce tyrosinkinas

Za běžných okolností se RTK vyskytují v buňce bez přítomnosti ligandu nefosforylované a tedy inaktivní. Aktivace probíhá po vazbě ligandu a následnou autofosforylací a dimerizací, jež poruší autoinhibici, která vyústí v aktivaci enzymu. V aktivační smyčce tyrosinkinasy dochází k přeorientování klíčových aminokyselinových zbytků. Reorientace aminokyselinových zbytků výrazně zvýší katalytickou funkci enzymu a následkem toho dojde k aktivaci mnoha signálních drah. Fosfatasa inaktivuje tyrosinkinasy hydrolýzou fosforylovaného tyrosinu a je i zodpovědná za indukci tyrosinkinasových inhibitorů [Krause a Van Etten, 2005]

Příkladem mechanismu, jehož porucha vede k vývoji chronické myeloidní leukemie, (CML) je fúze nereceptorových tyrosinkinas s partnerskými proteiny. Oligomerizací vzniklý fúzní protein BCR-ABL již není autoinhibován a dochází u něj k autofosforylaci. Druhým možným příkladem je u akutní myeloidní leukemie mutace receptoru FLT3 („fms-like tyrosine kinase 3“) způsobující trvalou aktivaci kinasy i bez přítomnosti jejího ligandu. Dalším příkladem může být bodová mutace v kinasové doméně EGFR (epidermální receptorový

růstový faktor), jež způsobí zvýšenou citlivost na přítomnost ligandu. Následkem dané bodové mutace může dojít k vývoji nemalobuněčného karcinomu plic.

[Krause a Van Etten, 2005]



Obrázek č. 4- Tyrosinkinasové receptory a jejich signální dráhy

[<http://compoundlibraries.com/index.php/2012/01/27/tyrosine-kinase-targeted-compound-libraries/>, upraveno (přístup 21.3.2016)]

1.4.3 Cíle inhibice tyrosinkinas

Snahou při vývoji nových inhibitorů tyrosinkinas je nalézt molekuly, jež zainhibují "zacílenou" kinasu s co nejmenšími vedlejšími účinky. První možností je využít molekuly, jež interferují s vazbou ATP nebo substrátu na enzym. Dalším přístupem, jak inaktivovat tyrosinkinasy, je zabránění jejich oligomerizaci. Je také možné inhibovat tyrosinkinasy snížením stability Hsp90 („heat-shock protein 90“). Destabilizace Hsp90 naruší vazebné schopnosti proteinů, jako je BCR-ABL nebo Her-2 („human epidermal growth factor receptor-2 „), jejichž následkem dojde k degradaci daného enzymu. V neposlední řadě je možné inhibovat funkci tyrosinkinas pomocí protilátek, jež "neutralizují" ligandy nebo receptory tyrosinkinas. [Krause a Van Etten, 2005]

1.4.4 Druhy inhibitorů tyrosinkinas

Inhibitory tyrosinkinas využívané v dnešní době jsou malé molekuly, inhibující aktivitu enzymu vazbou do aktivního centra pro ATP (adenosintrifosfát). Většina inhibitorů se od sebe strukturně liší, což naznačuje velký potenciál vývoje nových léků, při využití mnoha různých druhů skeletů u nových inhibitorů. Velký potenciál vývoje nových léčiv naznačuje i fakt, že dochází zatím pouze k inhibici místa pro vazbu ATP. [Levitzki, 2013]

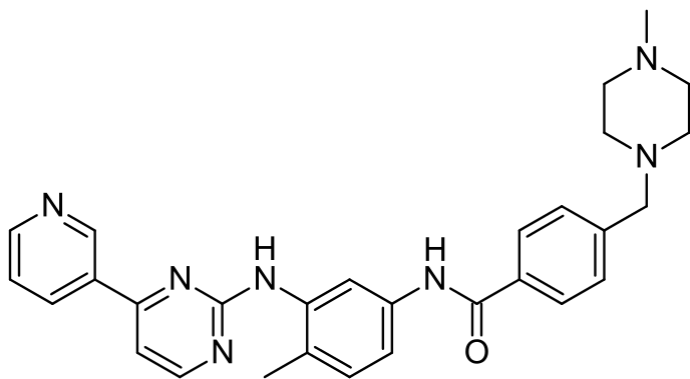
1.4.4.1 Imatinib (Gleevec, STI571)

Imatinib (2-fenylaminopyrimidin (obrázek č. 13)) byl vyvinut jako inhibitor Abl („Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“) tyrosinkinas v Bcr-Abl onkoproteinu (breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1). Vysoká účinnost léku měla zásadní dopad při léčbě pacientů s chronickou myeloidní leukemií a na vývoj nových inhibitorů tyrosinkinas. [Shchemelinin et al, 2006]

Bodová mutace na chromozomu 22 (Filadelfský chromosom), vedoucí k fúzi Abl („Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“) s Bcr („breakpoint cluster region protein“), je zodpovědná za konstitutivně aktivní tyrosinkinasu. Imatinib se váže do vazebného místa pro ATP a tím zabraňuje fosforylaci tyrosinu. Tímto mechanismem dochází k trvalé inhibici enzymu. [Giunti et al, 2013; Krause a Van Etten, 2005]

Imatinib je také inhibitorem tyrosinkinas Kit („Mast/stem cell growth factor receptor“-c-KIT), ARG („ABL-related gene“) a receptorů destičkového růstového faktoru („Platelet-

derived growth factor receptor“-PDGFR). Při léčbě pacientů s chronickou myelomonocytární leukémií (CMML), jež je zapříčiněna konstitutivní mutací tyrosinkinasy PDGFR α , byla zaznamenaná klinická i molekulární odpověď. Při léčbě medulárního karcinomu štítné žlázy měl však bohužel imatinib neuspokojivé výsledky ve druhé fázi klinického testování. Většina pacientů nevykazovala žádnou objektivní odpověď, pouze minoritní skupina dosáhla stabilizace karcinomu. [Giunti et al, 2013; Krause a Van Etten, 2005]



Obrázek č. 5-Strukturní vzorec imatinibu

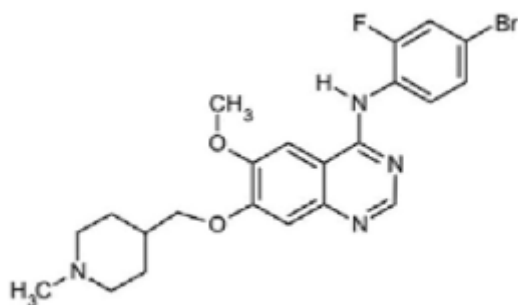
[<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Imatinib2DACS.svg> (přístup 21.3.2016)]

1.4.4.2 Vandetanib (ZD6474)

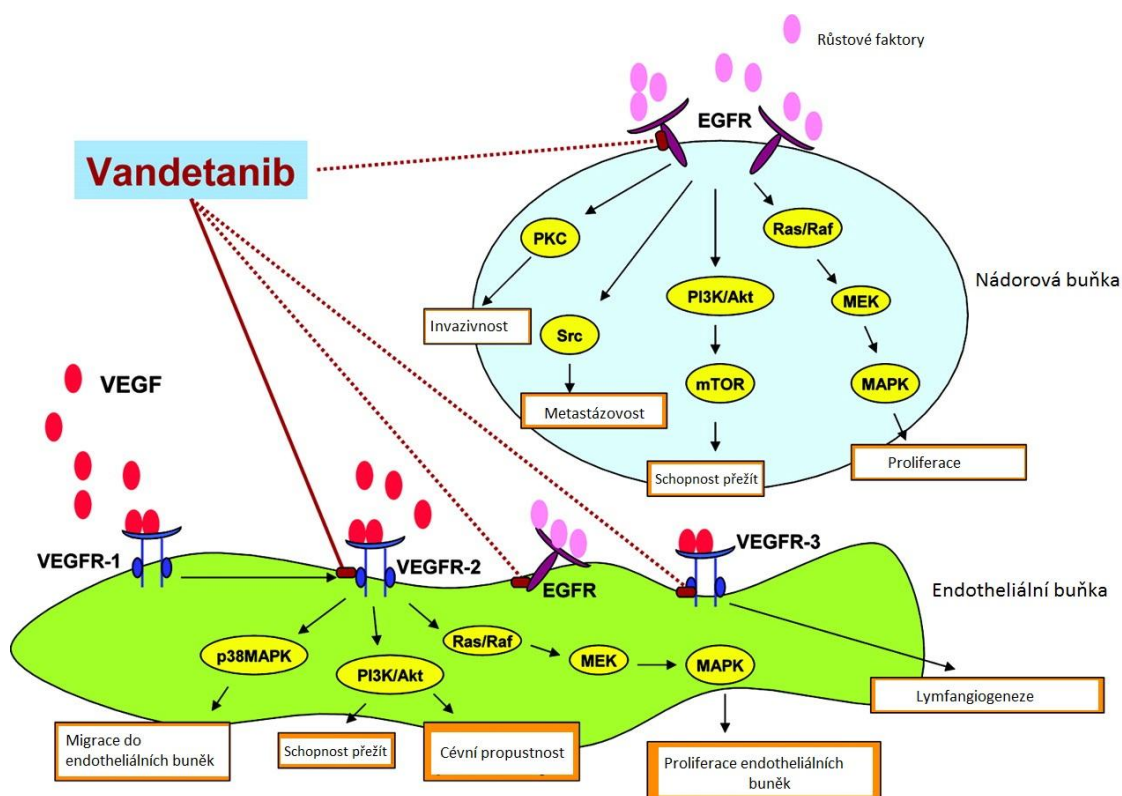
Je to orálně užívané léčivo o molekulové hmotnosti 475,36 (obrázek č. 7). Vandetanib zacíluje receptory neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk (RET), receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 2 a 3 (VEGFR2 a 3) a ve vyšších koncentracích i receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR). Zjednodušený mechanismus působení léčiva při léčbě maligního mezoteliomu je zobrazen na obrázku č. 7. Tento tyrosinkinasový inhibitor selektivně zacíluje signální dráhy, zásadní pro růst nádoru a angiogenezi. Jako i ostatní proteinkinasy, nemá přímý cytotoxický efekt na epiteliální buňky. Většina mutantních VEGFR prokazuje citlivost na léčbu vandetanibem, až na mutantní tyrosinkinasy, kde došlo k záměně valinu 804 za methionin nebo za leucin. Tato mutace vyvolávající rezistenci vůči vandetanibu byla zaznamenána u některých pacientů MEN2A (Mnohočetná endokrinní neoplazie 2), a je zapříčiněna sférickým zabráněním místa pro vazbu na tyrosinkinasu. Naopak záměna valinu 804 za glycin zvýšila citlivost VEGFR vůči vandetanibu. Po inhibování aktivity VEGFR však dochází ke stimulaci EGFR, jež nahrazují inhibované tyrosinkinasy. Z toho důvodu se předpokládá, že při léčbě nádorů vandetanibem je nutné využít duální inhibice VEGFR i EGFR. Inhibice EGFR je však důležitá také z důvodu

Úspěch léčiva byl zaznamenán v druhé fázi klinických testů vandetanibu při léčbě pokročilé a metastázované MTC. Pacientům bylo podáváno 300 mg vandetanibu každý den. V této studii došlo u 73% procent pacientů ke stabilizaci nádoru a u 20% pacientů došlo alespoň k částečné odpovědi na léčbu vandetanibem. [Wells et al, 2010]

V dubnu roku 2011 FDA (US Food and Drug Administration) schválila vandetanib pro léčbu symptomatického nebo progresivního medulárního karcinomu štítné žlázy u pacientů s neoperovatelnou lokálně pokročilou nebo metastázovanou rakovinou na základě výše uvedených výsledků z třetí fáze klinických testů. Na základě výsledků se ukázalo, že tento inhibitor tyrosinkinasy prodloužil život pacientů o 11 měsíců a míru objektivní odpovědi (ORR) mělo 45% pacientů. [Giunti et al, 2013]



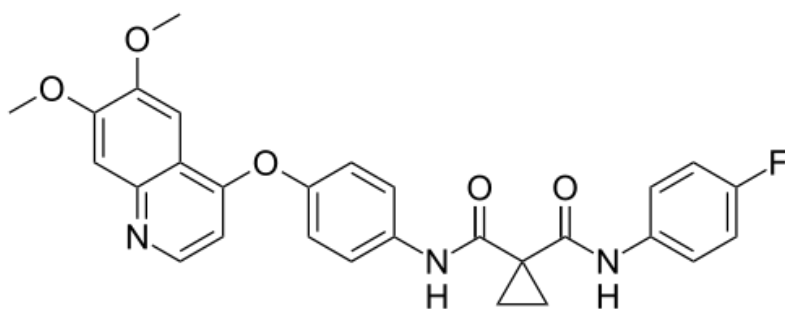
24



Obrázek č. 7- Vandetanib jako potenciální protinádorové činidlo v maligním mezoteliomu. Terapeutické agens, jež inhibuje několik tyrosinkinas (multikinasová inhibice). [http://theoncologist.alphamedpress.org/content/14/4/378/F2.expansion *upraveno* (přístup 21.3.2016)]

1.4.4.3 Cabozantinib (XL184)

Cabozantinib je další ze skupiny nízkomolekulárních orálních inhibitorů tyrosinkinas (viz obr. 9). Zacíljuje se specificky na tyrosinkinasy RET (receptory pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk), MET (receptory hepatocytárního růstového faktoru), VEGFR 2. Předpokládá se, že receptorová tyrosinkinasa MET je zodpovědná za „spouštění“ růstu nádoru a jeho angiogenesi. První fáze klinického testování cabozantinibu, ve které bylo podáváno pacientům 140 mg /den, ukázala velice povzbudivé výsledky. Období přežití bez progresu u pacientů, jimž byl podáván cabozantinib, byl 11,2 měsíce oproti 4 měsícům u placebo. [Giunti et al, 2013; Elisei et al, 2013]



Obrázek č. 8- Strukturní vzorec cabozantinibu [<http://en.wikipedia.org/wiki/Cabozantinib> (přístup 21.3.2016)]

1.5. NÁDORY ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

Rakovina štítné žlázy (TC) je nejběžnější maligní endokrinní tumor. Přestože jejich incidence je nízká, tvoří asi 0,5-1% všech karcinomů. Výskyt se liší v závislosti na geografických podmínkách, v České republice tvoří přibližně 400 případů ročně. [Límanová, 2003] Avšak za několik posledních desetiletí rapidně roste incidence nádorů štítné žlázy. V USA se mezi lety 2007 do 2011 zvýšila incidence o 4,4% ročně. [Siegel et al, 2016] Přes 90% nově diagnostikovaných nádorů tvoří diferenciované karcinomy štítné žlázy. Ke vzácnějším formám se řadí například medulární karcinom, lymfom štítné žlázy, anaplastický karcinom a karcinom Hurtleho buněk. [Nix et al, 2005]

1.5.1 Diferenciované karcinomy štítné žlázy

Mezi diferenciované nádory štítné žlázy se řadí papilární a folikulární karcinom. Papilární karcinom však představuje zhruba 70-80% všech diferenciovaných karcinomů štítné žlázy. Za snížení incidence folikulárního karcinomu je zodpovědné převážně zavedení jodace potravin. V České republice je pro léčbu většinou nezbytná totální tyreoidektomie a následné odstranění všech lokálních uzlin v krční oblasti. [Límanová, 2003] Radiojodová terapie pomocí I^{123} následuje po chirurgickém zákroku, jež odstraní zbývající thyroideální tkáň a zničí

případné vzdálené metastáze. Pacient však již celoživotně užívá supresor TSH (hormon stimulující štítnou žlázu) s tyroxinem. Kombinace tyreoidektomie a následné radioterapie zde výrazně snižuje případný relaps nádoru. [Nix et al, 2005]

1.5.2 Medulární karcinom štítné žlázy (MTC - Medullar Thyroid Cancer)

Medulární karcinom štítné žlázy vychází z neuroendokrinních buněk C, neboli parafolikulárních buněk tvořících kalcitonin [Nix et al, 2006]. Patří mezi karcinomy s relativně nízkou incidencí, tvoří 3,2% z celkového množství všech nádorů štítné žlázy. Onemocnění má dvě formy, z čeho sporadická forma je častější (75%) a méně častou je forma familiární (25%). Dědičnou je pouze familiární forma, jež je děděna autozomálně dominantně. Familiární forma má tři varianty. První variantou je familiární medulární karcinom štítné žlázy (FMTC), další variantou je mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2A (MEN 2A) a třetí variantou je mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2B (MEN 2B). [Bendlová et al, 2009]

Léčba probíhá nejčastěji operačním vyjmutím štítné žlázy, kombinovanou s radiojodovou terapií a doživotním dodáváním supresorů thyreotropního hormonu. [Nix et al, 2006] Pacienti, jež byli včasné diagnostikováni, mají většinou příznivou prognózu (70-80% se dožívá více než 10 let). Bohužel však většina případů je diagnostikována až v pozdějších stádiích s metastázemi v lymfatických žlázách a ve vzdálených orgánech. V tomto stádiu je šance dožití více než 10 let jen přibližně 40%. V pokročilých stádiích již je obvykle nádor neoperovatelný a téměř nereaguje na chemoterapeutika. Avšak nedávné výzkumy pomohly porozumět genetickým defektům a pozměněným signálním drahám, jež úzce souvisí s vývojem medulárního karcinomu štítné žlázy. Poslední poznatky naznačují, že primárními onkogenními činiteli jsou defektní tyrosinkinasy RET. Nová terapeutická agens se již zaměřují primárně na tyto defektní tyrosinkinasy, u nichž došlo k alteraci aktivity. Problémem nových léčiv, inhibujících tyrosinkinasy je, že nedochází většinou k permanentnímu vyléčení nemoci. Medulární karcinom štítné žlázy si po nějaké době vytvoří rezistenci vůči inhibitorům. Mechanismem rezistence je vznik nových signálních drah, neinhibovaných léčivem. Následně dojde k opětovné progresi nádoru. Předpokládá se však, že kombinovaná léčba by mohla mít slibnější výsledky při inhibici karcinogeneze. [Giunti et al, 2013]

1.5.2.1 Signální cesta medulárního karcinomu štítné žlázy

V posledních letech se ukazuje, že důležitou roli při vzniku medulárního karcinomu štítné žlázy má hlavně protoonkogen RET. Onkogenem kódovaná receptorová tyrosinkinasa se váže k GDNF („glial cell line-derived neurotrophic factor“) proteinům. Kaskáda reakcí vede k aktivaci RAS/MAPK a fosfatidylinositol-3'-kinasy (PI3K)/Akt signalizačních drah. Tyto signální dráhy jsou zásadní pro buněčný růst a diferenciaci nádorů. Bodové mutace, zodpovědné za aktivaci tyrosinkinas, byly zaznamenány téměř ve všech familiárních formách medulárního karcinomu štítné žlázy. Avšak i v 30-50% sporidických formách byla nalezena mutace v protoonkogenu RET. Tyto informace prokazují důležitost inhibice tyrosinkinasy RET. [Giunti et al, 2013]

I přesto, že je tyrosinkinasa RET zásadní, mohou hrát i ostatní tyrosinkinasy roli ve vývoji a progresi medulárního karcinomu štítné žlázy. Receptorová tyrosinkinasa EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru), jež je podobná tyrosinkinase RET, je zodpovědná za regulaci buněčného růstu, proliferaci a apoptózu. [Giunti et al, 2013] Ukazuje se, že u mnoha typů karcinomů štítné žlázy je EGFR mnohonásobně exprimován. Nedávné analýzy různých typů medulárních karcinomů štítné žlázy ukazují, že se mutace v EGFR vyskytuje zhruba u 20% těchto nádorů. [Erovic et al, 2012] Většina pacientů s defektní tyrosinkasou v EGFR patřila do jedné podrodiny nádorů. U této podrodiny MTC by bylo tedy vhodné inhibovat i tyrosinkasu EGFR. Nové studie také naznačují, že EGFR může být zodpovědná za aktivaci RET. Tato data naznačují, že EGFR hraje roli v MTC, avšak jak moc významnou, je nutné ještě dále prostudovat. [Giunti et al, 2013]

Mezi další důležité signální dráhy při vývoji a progresi medulárního karcinomu štítné žlázy se řadí tyrosinkinasa VEGFR (receptory cévního endoteliálního růstového faktoru), MET (hepatocytární růstový faktor), FGFR (receptory fibroblastového růstového faktoru) a je možné že i PDGFR (receptory destičkového růstového faktoru), avšak jejich role musí být ještě dále objasněna. [Giunti et al, 2013]

1.5.3 Hurtleho karcinom

Karcinom Hurtleho buněk tvoří zhruba 3% ze všech nádorů štítné žlázy a lze ho hodnotit jako folikulární karcinom. [Hundahl et al, 1998] Běžně je léčen totální thyreoidektomií, po níž následuje léčba radiojódem. Léčba radijójódem zde ovšem nefunguje

tak dobře jako u diferencovaných karcinomů štítné žlázy, jelikož Hurtleho karcinom přijímá radiojód v daleko menší míře. [Nix et al, 2006]

1.5.4 Anaplastický karcinom štítné žlázy

Anaplastický karcinom štítné žlázy se řadí mezi velmi agresivní formy nádorů štítné žlázy. Tvoří celkově méně než 2% z celkové incidence všech nádorů štítné žlázy. Nejčastěji zasahuje pacienty okolo sedmdesáti let života. Bohužel, oproti ostatním relativně dobře léčitelným nádorům štítné žlázy, u anaplastického karcinomu štítné žlázy není efektivní ani operační léčba, ani léčba radiojódem. Střední doba života pacientů od diagnózy je mezi 2-6 měsíci. Částečné odpovědi bylo zaznamenáno pouze po dodání doxorubicinu, lékaři se proto snaží stále najít vhodnou kombinaci různých chemoterapií. [Schlumberger et al, 2004].

1.6. METABOLISMUS LÉČIV

Rozdílný metabolismus xenobiotik mezi jednotlivci hraje důležitou roli při výběru a dávkování léčiva. [Linder et al, 1997] Šance, že chemoterapeutikum bude u každého jedince metabolizováno individuálně, musí být bráno v potaz. Enzymy, účastníci se biotransformačních procesů, probíhající v organismu, můžeme rozdělit do dvou skupin. Enzymy, jež jsou zodpovědné za oxidaci, redukci a hydrolýzu, řadíme mezi enzymy I. fáze biotransformace. Do druhé fáze biotransformace zahrnujeme konjugální enzymy. [Vermees et al, 1997; Ferreira et al, 2006]

1.6.1 Cytochromy P450

Mezi cytochromy P450 se řadí velká část enzymů, jež se účastní I. fáze biotransformace xenobiotik (tedy i terapeutických agens). Cytochromy P450 jsou součástí vícesložkového monooxygenasového systému (MFO – „mixed function oxidases“). V tomto systému jsou cytochromy P450 terminálními oxygenasami I. Mezi další části systému MFO se řadí NADPH:cytochrom P450 reduktasa a membrána endoplazmatického retikula. Monooxygenasový systém je přítomen v širokém spektru živočichů (od bakterií a kvasinek až po savce). Další funkcí těchto enzymů je metabolismus endogenních látek, jako je oxidační metabolismus mastných kyselin, biosyntéza látek steroidní povahy a žlučových kyselin. V buňce jsou cytochromy P450 lokalizovány v membráně endoplazmatického retikula, vnější

jaderné membráně a mitochondriální membráně. Dále tvoří součást peroxisomů, Golgiho aparátu a plazmatické membrány. [Stiborová et al, 2004]

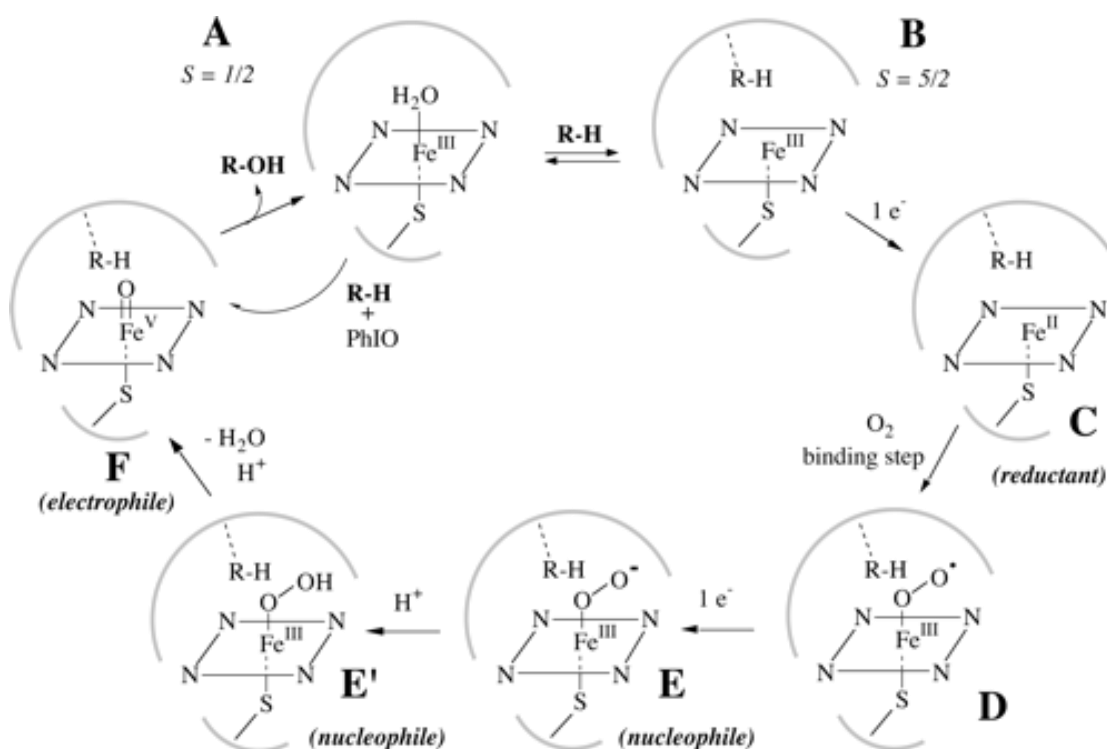
Oxygenasy se smíšenou funkcí inkorporují jeden atom kyslíku do substrátu a druhý atom kyslíku je redukován na molekulu vody. Monooxygenasovou reakci katalyzovanou cytochromy P450 lze zapsat sumární rovnicí



RH je v této reakci substrát a **ROH** je hydroxylovaný produkt reakce.

Aktivní centrum cytochromu P450 tvoří protoporfyrin IX, jež je stabilizovaný hydrofóbním efektem. Na rozdíl od většiny hemoproteinů tvoří pátý ligand cytochromu P450 thiolátový anion, nacházející se v aktivním centru cysteinu.

Reakční cyklus cytochromu P450 je tvořen několika základními kroky. V klidovém stavu je hemové železo v trojmocné formě. Ferri forma je hexakoordinovaná a v nízkospinovém stavu. Na trojmocné železo je navázaná molekula vody, jež je následně vytlačena vazbou substrátu do aktivního centra. Po jedoelektronové redukci katalyzované NADPH:cytochrom P450 reduktasou dochází k přechodu železa ferri formy na ferro formu a tím i vysokospinový stav. Ve vysokospinovém stavu se ion železa nachází v pentakoordinované formě. Následná vazba molekuly kyslíku způsobí opětovný přechod do hexakoordinovaného stavu a vznik ternárního komplexu. Ternární stav je labilizován redukcí dalším elektronem získaným od NADPH:cytochrom P450 reduktasy a nebo NADH:cytochrom b5 reduktasy. Následkem labilizace dojde ke štěpení vazby mezi oběma kyslíky a k přenosu dvou protonů na jednu z molekul kyslíku za vzniku vody. Druhý atom kyslíku je přenesen na molekulu substrátu za současné regenerace cytochromu P450. [Stiborová et al, 2004; Meunier et al, 2004]



Obrázek č. 9 – Reakční cyklus cytochromu P450 v několika krocích [Meunier et al, 2004]

1.6.2 Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy jsou mikrosomální enzymy, důležité v metabolismu xenobiotik. Jejich hlavní funkce spočívá v navázání kyslíku na lipofilní sloučeninu, jež může být pak snáze sekretovaná. V lidském organismu se nachází 11 genů tohoto enzymu, z čehož se předpokládá, že 6 z nich jsou pseudogeny. FMO 1 a 3 jsou hlavní izoformy, přičemž FMO 1 se nachází převážně ve fetálních játrech, u dospělého jedince v ledvinách a FMO 3 hlavně v játrech u dospělých jedinců. [Eswaramoorthy et al, 2007; Hernandez et al, 2004]

Flavinové monooxygenasy, přítomné v živočišných organismech, obsahují kofaktor FAD. V buňce jsou lokalizovány v endoplasmatickém retikulu. Monooxygenasa, jež bývá také z historických důvodů nazývána Zieglerovým enzymem, má molekulovou hmotnost 60 000. Jejich dalším koenzymem je NADPH. Tyto jednosložkové monooxygenasy preferenčně hydroxylují terciální a sekundární aminy. [Stiborová et al, 2004] Flavinové monooxygenasy jsou zodpovědné za oxidační metabolismus širokého spektra sloučenin, obsahujících

nukleofilní dusík, síru, selen a fosforované heteroatomy. [Koukouritaki et al, 2002] Mechanismus jejich účinku se skládá z několikakrokového procesu. Nejprve dochází k redukci FAD pomocí NADPH. FAD, jež ztratil 2 elektrony, reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku relativně stabilního peroxoflavinového intermediátu. Ten reaguje s nukleofilním substrátem. Nejpomalejší krok procesu je přeměna druhého kyslíku na molekulu vody. Posledním krokem biotransformace je uvolnění NADP^+ . [Krueger a Williams, 2005]

1.6.3 Peroxidasy

Peroxidasy patří mezi enzymy I. fáze biotransformace. Tyto enzymy k oxidaci substrátu využívají redukci lipidových hydroperoxidů či peroxidu vodíku v procesu známém jako kooxidace. Ostatní biotransformační enzymy vyžadují jako kofaktor NADPH nebo NADH. Peroxidasy se vyskytují v mnoha tkáních, například v tkáni ledvin, kostní dřeni, krevních destičkách, etc.

[Parkinson, 2001]

Peroxidasy jsou ve většině případů hemoglykoproteiny. Jejich typickou prostetickou skupinou je ferriprotoporfyrin IX, jež obsahuje pentakoordinované trojmocné železo. V přírodě se vyskytuje však relativně vysoká variabilita těchto enzymů, jež mají například železo zaměněné za dvojmocný mangan nebo pětimocný vanad. Hem však tvoří katalytické centrum u většiny peroxidas. [Stiborová et al, 2004]

1.6.4 Konjugační enzymy

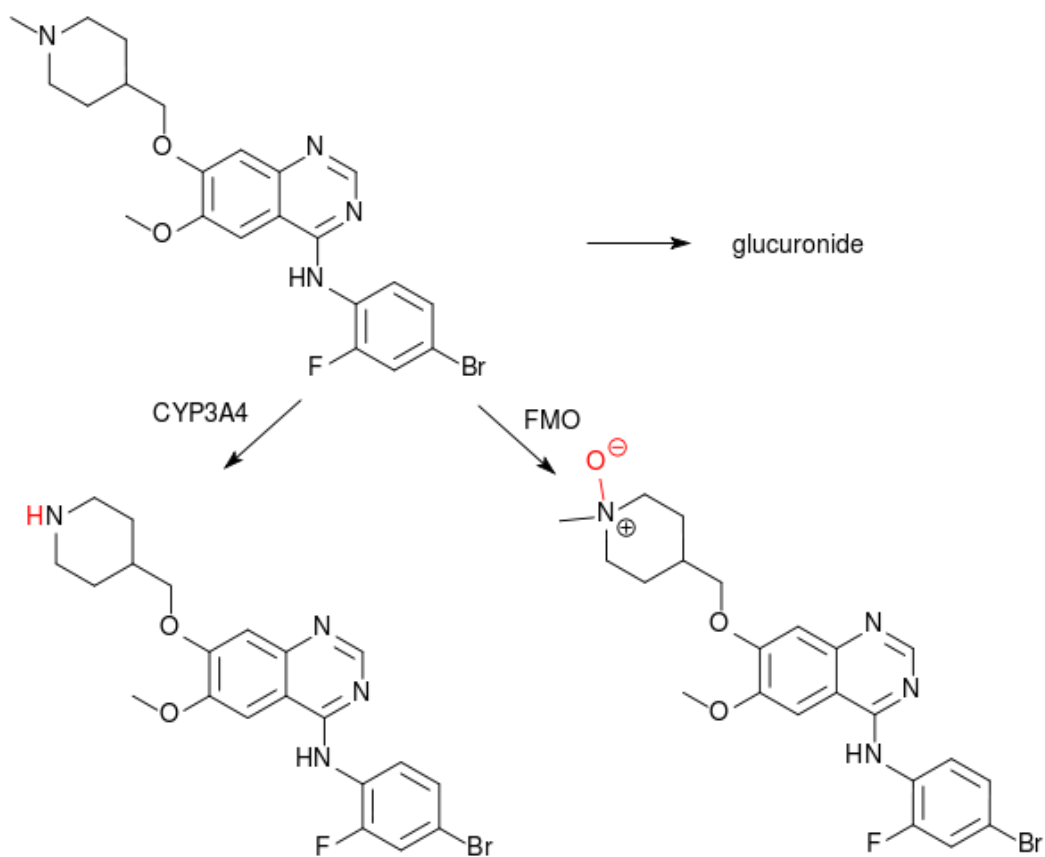
Konjugační enzymy se účastní druhé fáze biotransformace. Katalyzují glukuronidace, sulfatace, acetylce, methylce, konjugace s aminokyselinami (například glycin, taurin, glutamová kyselina) a glutathionem. Xenobiotika, u nichž dochází k druhému kroku biotransformace, obsahují převážně hydroxylovou, aminovou, epoxidovou nebo halogenovou funkční skupinu. Kofaktory těchto enzymů reagují s funkčními skupinami xenobiotik, jež mají dané funkční skupiny přítomny, nebo byly na xenobiotikum zavedeny v I. fázi biotransformace. Důvodem existence těchto enzymů je velké zvýšení hydrofility cizorodých látek a jejich následná exkrece z organismu. Většina konjugačních enzymů je přítomná v cytosolu, až na UDP-glukuronosyltransfery, jež je mikrosomální enzym [Parkinson, 2001; Levi, 2010]

Glukuronidace je hlavní cestou metabolismu xenobiotik v organismu člověka. Enzymem katalyzujícím glukuronidaci je UDP-glukuronosyltransferasa. Mechanismem působení je konjugace kyseliny glukuronové na funkční skupinu xenobiotika. Tímto mechanismem se zvýší polarita a až na výjimky sníží toxicita cizorodé látky a usnadní exkrece lipofilních xenobiotik. [Parkinson, 2001; Levi, 2010]

1.6.5 Metabolismus vandetanibu

Nedávné studie *in vitro* naznačují, že vandetanib je biotransformován v lidském organismu. Předpokládá se, že je v první fázi biotransformace přeměnován cytochromem P450 3A4 (CYP3A4) na N-desmethylvandetanib. Studie dále naznačují, že flavinmonooxygenasový systém v játrech (FMO3) a v ledvinách (FMO1) oxiduje vandetanib na vandetanib N-oxid (obrázek č.15). Ve studii, prokazující přítomnost daných dvou metabolitů v lidském organismu, byl radioznačený vandetanib (¹¹C-vandetanib) podáván zdravým jedincům. Oba metabolity byly nalezeny v plazmě, moči i výkalech jedinců. [Martin et al, 2011; Yoshimoto et al, 2015]

Metabolit přeměněný CYP3A4 má podobnou účinnost jako parentální molekula. Oproti tomu vandetanib N-oxid má 50krát nižší efektivitu a tím i výrazně sníženou terapeutickou účinnost. Při léčbě nádorů vandetanibem, kdy pacienti přijímají i široké spektrum jiných léčiv, může docházet k indukci nebo inhibici FMO a CYP3A4. Případná indukce nebo inhibice biotransformačních enzymů může mít tedy zásadní dopad na léčbu pacienta. Vzhledem k tomu, že však uvedený metabolismus byl pouze okrajově studován v předběžných experimentech, jeho metabolismus biotransformačními enzymy vyžaduje hlubší prostudování. Přesné porozumění vlivu biotransformačních enzymů na metabolismus vandetanibu má tedy zásadní dopad na účinnost léku a zmírnění jeho vedlejších účinků. [Martin et al, 2011]



Obrázek č. 10 Biotransformace parentální molekuly (vandetanibu) cytochromem P450 3A4 na N-desmethylvandetanib a pomocí flavinové monooxygenasy na vandetanib N-oxid
[\[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vandetanib_metabolism.svg\]](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vandetanib_metabolism.svg) *upraveno* (přístup 21.3. 2016)]

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce byla identifikace enzymů podílejících se na metabolismu protinádorového léčiva vandetanibu a identifikace tvořených metabolitů. Konkrétními cíli bylo:

- Studium metabolismu vandetanibu jaterními mikrosomálními systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a potkanů premedikovaných induktory jednotlivých cytochromů P450.
- Studium metabolismu vandetanibu jaterními mikrosomálními systémy člověka
- Studium metabolismu vandetanibu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 a vliv cytochromu b₅ na tento metabolismus
- Studium metabolismu vandetanibu systémem lidských flavinmonooxygenas

3. Materiál a metody

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Lachema Brno, Česká republika

kyselina octová, methanol, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KCl, glycerol, cholát sodný, octan amonný

Merck, Německo

acetonitril

Sigma, USA

glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, dimetylsulfoxid (DMSO), fenacetin, nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP^+),

AstraZeneca

Vandetanib (Caprelsa; N-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]quinazolin-4-amine))

Lidské a potkaní cytochromy P450, systémy flavinmonooxygenas (FMO 1, 3, 5) v SupersomechTM, a lidské jaterní mikrosomy byly získány od společnosti BD Bioscience, Corning (USA). Lidské a potkaní rekombinantní cytochromy P450 a systémy lidských flavinových monooxygenas byly exprimované v hmyzích buňkách (BTI-TN-5B1-4) transfekovaných *Baculovirem*. Mikrosomy izolované z těchto buněk, označované jako SupersomyTM, pak byly použity v experimentech.

Potkaní jaterní mikrosomy získané z potkanů premedikovaných induktory jednotlivých cytochromů P450 a kontrolních potkanů, byly izolovány na katedře biochemie postupem popsáným v práci dle Stiborové [Stiborová et al, 1990].

3.2 PŘÍSTROJE

Automatické mikropipety

Nichiryo Nichipet EX (Japonsko)

Centrifugy

Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 45 (USA)

Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor (SRN)

Magnetická míchačka

Variomag, Monotherm (SRN)

pH metry

ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA) – přístroj kalibrován pomocí standardů

Hamilton (Švýcarsko)

Systém HPLC

pumpa: Dionex pump P580 (USA)

ASI-100 Automated Sample Injector (USA)

Degasys DG-1210 Dionex (USA)

UV/VIS Detector UVD 170S/340S (USA)

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101 (Ecom, ČR)

kolona: Macharey-Nagel (SRN), 100-5 C18, 5 µm, 250x4 mm

program: Chromeleon™ 6.11 build 490 (USA)

Další využívané přístroje

analytické váhy PESA 40SM-200 A (Švýcarsko)

MS 2 minishaker Schoeller Pharma Praha (Česká republika)

Thermomixer compact Eppendorf (USA)

3.3 METODY

3.3.1 Oxidace vandetanibu potkaními jaterními mikrosomy

Ke studiu metabolismu vandetanibu byly nejdříve použity jaterní mikrosomální systémy (MS) nepředikovaných potkanů (kontrolní skupina) a jaterní mikrosomální systémy potkanů premedikovaných Sudanem I, fenobarbitalem (PB), pregnenolonkarbonitrilem (PCN) a ethanolem. Premedikace potkanů sloužila k získání mikrosomálních frakcí s „nabohaceným” množstvím jednotlivých cytochromů P450.

Koncentrace proteinů v jednotlivých potkaních jaterních mikrosomálních systémech použitých pro experimenty jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka č. 1 - Koncentrace proteinů v izolovaných jaterních mikrosomech

Potkaní mikrosomy	Koncentrace proteinů [mg/ml]	Induktor	Indukovaný cytochrom P450
Kontrolní MS	18,9	-	-
Sudan I-MS	43,0	Sudan I	CYP1A
EtOH-MS	21,50	ethanol	CYP2E1
PB-MS	29,3	fenobarbital	CYP2B/C
PCN-MS	52,8	pregnenolonkarbonitril	CYP3A

Kontrolní MS- mikrosomy izolované z jater nepremedikovaných potkanů, Sudan I-MS- mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných Sudanem I, EtOH-MS- mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných ethanolem, PB-MS mikrosomy izolované z jater potkanů fenobarbitalem, PCN-MS- mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (PCN)

Potkaní jaterní mikrosomy získané z potkanů premedikovaných induktory jednotlivých cytochromů P450 a kontrolních potkanů, byly izolovány na katedře biochemie postupem popsaným v práci dle Stiborové [Stiborová et al, 1990].

Složení inkubační směsi:

- 0,25 mg proteinů mikrosomů (tabulka č. 1)
- 5 mM vandetanib v DMSO
- NADPH-generující systém (GS) obsahující 1 mM MgCl_2 ; 1 mM NADP^+ ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa
- 100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4

Inkubační směs o objemu 500 μl obsahovala: pufr (100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4), 5 μl 5 mM vandetanibu a mikrosomy v takovém množství, aby inkubační směs obsahovala 0,5 mg proteinu/ml.

Reakce byla iniciována přidávkem 50 μl GS a inkubována po dobu 30 minut za stálého třepání 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA) při 37 °C v otevřených zkumavkách.

Reakce byla ukončena přidáním 1 ml chloroformu a následným intenzivním protřepáním při 1400 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA). V následujícím kroku bylo přidáno 5 μl 1 mM fenacetinu (rozpuštěném v methanolu) jako vnitřního standardu pro analýzu pomocí HPLC.

Produkty reakce byly extrahovány chloroformem za stálého třepání (2 minuty). Po intenzivním třepání (1400 RPM) byla směs centrifugována 5 minut při 13 500 RPM (Centrifuge 5418, Eppendorf, SRN).

Po centrifugaci bylo odebráno 750 μl oddělené organické fáze obsahující produkty metabolické reakce. K vodné fázi bylo opětovně přidáno 750 μl chloroformu a extrakce směsi byla provedena stejným postupem.

Spojené extrakty (1,5 ml) byly odpařeny na vakuové odparce (Labconco, CentriVap Concentrator, USA). Vysušené vzorky byly uchovávány při - 20 °C až do analýzy pomocí HPLC. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny ve 25 μl methanolu a jednotlivé složky separovány pomocí HPLC jak je popsáno v kapitole 3.3.5.

3.3.2 Oxidace vandetanibu lidskými jaterními mikrosomy

Analogicky byly v experimentech použity místo potkaních mikrosomů mikrosomy lidských jater získané z komerčního zdroje (BD Bioscience, Corning, USA).

Koncentrace proteinů v jednotlivých lidských jaterních mikrosomálních systémech, použitých pro experimenty, jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka č. 2 - Koncentrace proteinů v izolovaných lidských jaterních mikrosomech

Lidské mikrosomy	Koncentrace proteinů [mg/ml]
Ženské MS	20
Mužské MS	20

Složení inkubační směsi:

- 0,25 mg proteinů mikrosomální frakce (tabulka č. 2)
- 5 mM vandetanib v DMSO
- NADPH-generující systém (GS) obsahující 1 mM MgCl_2 ; 1 mM NADP^+ ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa
- 100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4

Inkubační směs o objemu 250 μl obsahovala: pufr (100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4), 5 μl 5 mM vandetanibu a mikrosomy v takovém množství, aby inkubační směs obsahovala 0,5 mg proteinu/ml.

Reakce byla iniciována přidávkem 50 μl GS a inkubována po dobu 30 minut za stálého třepání 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA) při 37 °C v otevřených zkumavkách.

Reakce byla ukončena přidáním 1 ml chloroformu a následným intenzivním protřepáním při 1400 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA). V následujícím kroku bylo přidáno 5 μl 1 mM fenacetinu (rozpuštěném v methanolu) jako vnitřního standardu pro analýzu pomocí HPLC.

Produkty reakce byly extrahovány chloroformem za stálého třepání (2 minuty). Po intenzivním třepání (1400 RPM) byla směs centrifugována 5 minut při 13 500 RPM (Centrifuge 5418, Eppendorf, SRN).

Po centrifugaci bylo odebráno 750 μ l oddělené organické fáze obsahující produkty metabolické reakce. K vodné fázi bylo opětovně přidáno 750 μ l chloroformu a extrakce směsi byla provedena stejným postupem.

Spojené extrakty (1,5 ml) byly odpařeny na vakuové odparce (Labconco, CentriVap Concentrator, USA). Vysušené vzorky byly uchovávány při - 20 °C až do analýzy pomocí HPLC. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny ve 25 μ l methanolu a jednotlivé složky separovány pomocí HPLC jak je popsáno v kapitole 3.3.5.

3.3.3 Oxidace vandetanibu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 v SupersomechTM

Při studiu oxidace vandetanibu za pomoci rekombinantních cytochromů P450 byly použity cytochromy P450 potkana a člověka. Lidské a potkaní rekombinantní cytochromy P450 byly exprimované v hmyzích buňkách (BTI-TN-5B1-4) transfekovaných *Baculovirem*. Mikrosomy izolované z těchto buněk (SupersomyTM) pak byly použity v experimentech.

Složení inkubační směsi:

- 200 nM potkaní nebo lidské rekombinantní cytochromy P450 (v SupersomechTM)
- 5 mM vandetanib v DMSO
- NADPH-generující systém (GS) obsahující 1 mM MgCl₂; 1 mM NADP⁺; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa
- 100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4

Inkubační směs o objemu 250 μ l obsahovala: pufr (100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4), 5 μ l 5 mM vandetanib a lidské nebo potkaní cytochromy P450 v takovém množství, aby výsledná inkubační směs obsahovala 200 nM CYP.

Reakce byla iniciována přidávkem 50 μ l GS a inkubována po dobu 30 minut za stálého třepání 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA) při 37 °C v otevřených zkumavkách.

Reakce byla ukončena přidáním 1 ml chloroformu a následným intenzivním protřepáním při 1400 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA). V následujícím kroku bylo přidáno 5 μ l 1 mM fenacetinu (rozpuštěném v methanolu) jako vnitřního standardu pro analýzu pomocí HPLC.

Produkty reakce byly extrahovány chloroformem za stálého třepání (2 minuty). Po intenzivním třepání (1400 RPM) byla směs centrifugována 5 minut při 13 500 RPM (Centrifuge 5418, Eppendorf, SRN).

Po centrifugaci bylo odebráno 750 µl oddělené organické fáze obsahující produkty metabolické reakce. K vodné fázi bylo opětovně přidáno 750 µl chloroformu a extrakce směsi byla provedena stejným postupem.

Spojené extrakty (1,5 ml) byly odpařeny na vakuové odparce (Labconco, CentriVap Concentrator, USA). Vysušené vzorky byly uchovávány při - 20 °C až do analýzy pomocí HPLC. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny ve 25 µl methanolu a jednotlivé složky separovány pomocí HPLC jak je popsáno v kapitole 3.3.5.

3.3.4 Oxidace vandetanibu flavinovými monooxygenasami

Při studiu oxidace vandetanibu za pomoci systému flavinových monooxygenas byly použity lidské flavinmonooxygenasy (FMO) exprimované v mikrosomech hmyzích buněk (Supersomy™). Systémy lidských flavinových monooxygenas byly exprimované v hmyzích buňkách (BTI-TN-5B1-4) transfekovaných *Baculovirem*. Mikrosomy izolované z těchto buněk (Supersomy™) pak byly použity v experimentech.

Koncentrace proteinů v jednotlivých systémech flavinových monooxygenas, použitých pro experimenty, jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka č. 3 - Koncentrace proteinů v lidských flavimooxygenasach v Supersomech™

Mikrosomální systém flavinmonooxygenas	Koncentrace proteinů [mg/ml]
FMO 1	5
FMO 3	5
FMO 5	5

Složení inkubační směsi:

- lidské flavinmonooxygenasy (FMO) v SupersomechTM (tabulka č. 3)
- 5 mM vandetanib v DMSO
- NADPH-generující systém (GS) obsahující 1 mM MgCl₂; 1 mM NADP⁺; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa
- 100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4

Inkubační směs o objemu 250 µl obsahovala: pufr (100 mM K-fosfátový pufr, pH 7,4), 5 µl 5 mM vandetanib a 25 µl SupersomůTM obsahujících lidské flavinmonooxygenasy.

Reakce byla iniciována přidáním 50 µl GS a inkubována po dobu 30 minut za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA) při 37 °C v otevřených zkumavkách.

Reakce byla ukončena přidáním 1 ml chloroformu a následným intenzivním protřepáním při 1400 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf, USA). V následujícím kroku bylo přidáno 5 µl 1 mM fenacetinu (rozpuštěném v methanolu) jako vnitřního standardu pro analýzu pomocí HPLC.

Produkty reakce byly extrahovány chloroformem za stálého třepání (2 minuty). Po intenzivním třepání (1400 RPM) byla směs centrifugována 5 minut při 13 500 RPM (Centrifuge 5418, Eppendorf, SRN).

Po centrifugaci bylo odebráno 750 µl oddělené organické fáze obsahující produkty metabolické reakce. K vodné fázi bylo opětovně přidáno 750 µl chloroformu a extrakce směsi byla provedena stejným postupem.

Spojené extrakty (1,5 ml) byly odpařeny na vakuové odparce (Labconco, CentriVap Concentrator, USA). Vysušené vzorky byly uchovávány při - 20 °C až do analýzy pomocí HPLC. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny ve 25 µl methanolu a jednotlivé složky separovány pomocí HPLC jak je popsáno v kapitole 3.3.5.

3.3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) sledující metabolismus vandetanibu

Tvorba oxidačních metabolitů vandetanibu ve vzorcích připravených v kapitolách 3.3.1 -3.3.4 byla analyzována pomocí RP-HPLC (reverse phase - High-performance liquid chromatography) na koloně C18 (Macharey-Nagel, SRN, 100-5 C18, 5 μ m, 250x4 mm) při teplotě 35 °C. Vzorky získané z inkubačních směsí byly aplikovány v množství 20 μ l. Použita byla izokratická eluce pomocí mobilní fáze tvořené z 20% 20 mM octanu amonného a 80% acetonitrilu o pH upraveném kyselinou octovou na hodnotu pH 3. Před analýzou byla mobilní fáze sonikována pro odstranění vzduchu. Eluce složek směsi pomocí HPLC probíhala 20 minut při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Detekce jednotlivých složek inkubační směsi probíhala při vlnové délce 341 nm.

3.3.6 Identifikace metabolitů vandetanibu

Metabolity vandetanibu tvořené oxidací PCN mikrosomy (viz 3.3.1), byly izolovány pomocí HPLC (viz kapitola 3.3.5). Spojené frakce obsahující jednotlivé metabolity byly analyzovány hmotnostní analýsou. Analýza za použití hmotnostního spektrometru (Bruker Solarix, USA, 12T FTMS) byla provedena RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D.

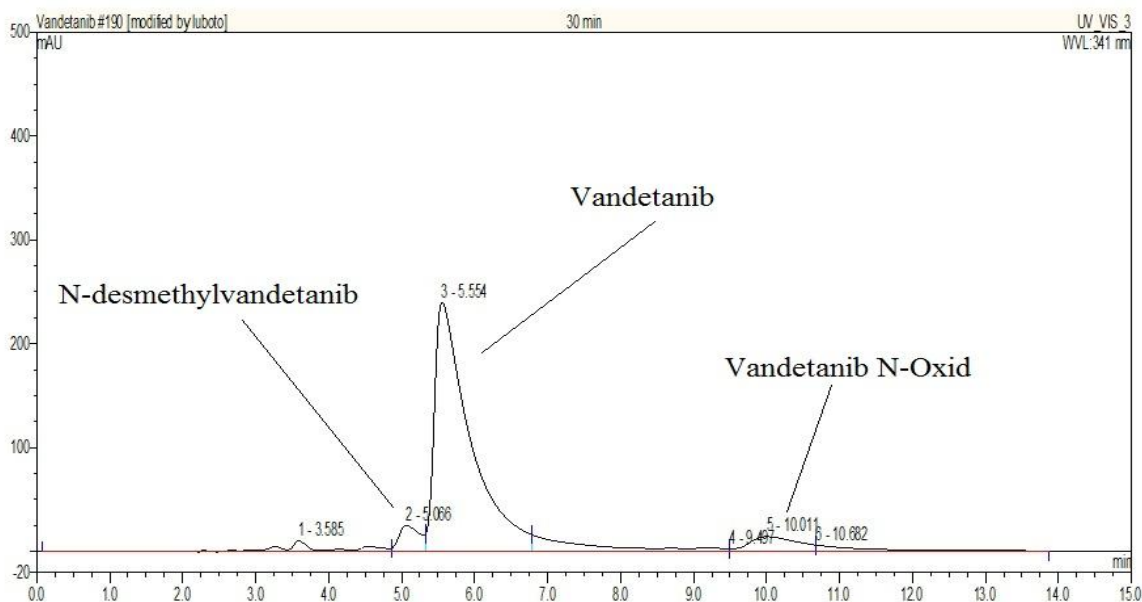
4. VÝSLEDKY

4.1 OXIDACE VANDETANIBU JATERNÍMI MIKROSOMY POTKANA

Metabolismus vandetanibu byl studován *in vitro*, za použití jaterních mikrosomů obsahujících všechny složky monooxygenasového systému, lokalizovaného v membráně endoplasmatického retikula [Stiborová et al, 2004].

4.1.1 Separace metabolitů vandetanibu pomocí RP-HPLC

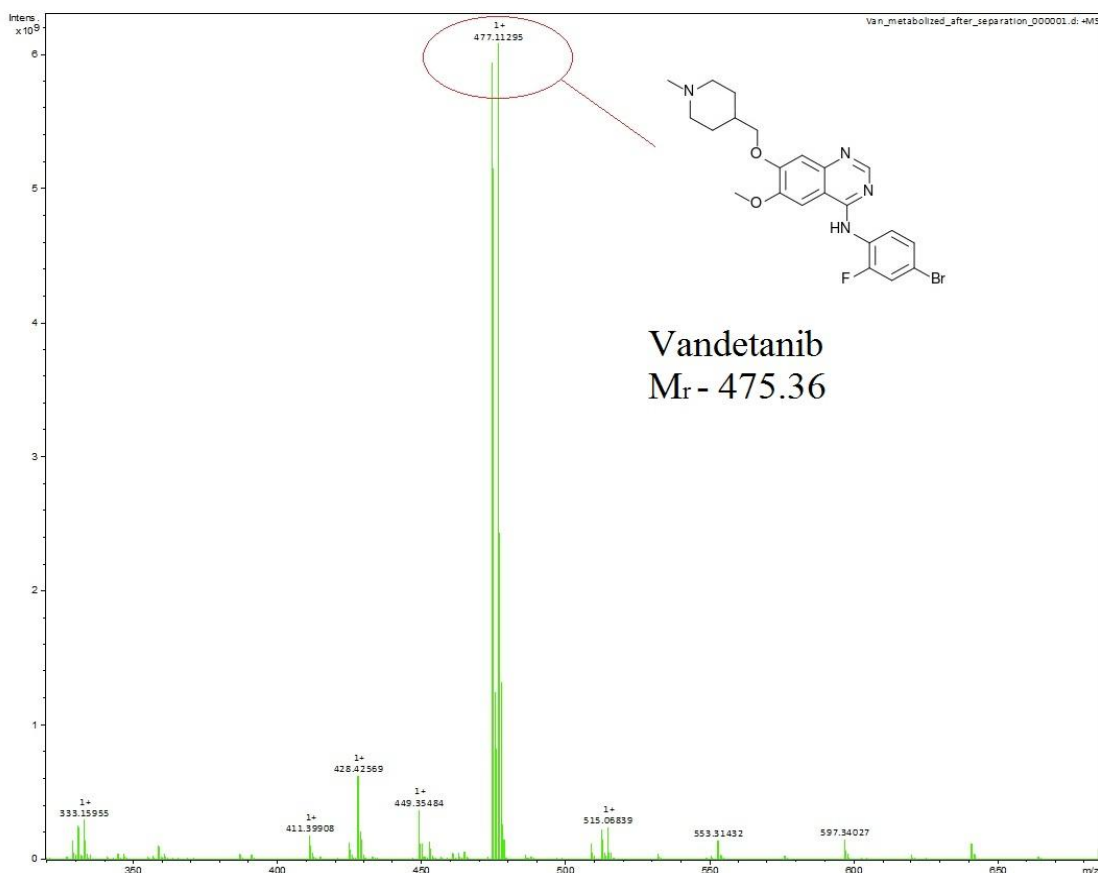
Postup separace vandetanibu a jeho metabolitů pomocí HPLC je podrobně popsán v kapitole 3.3.5. K identifikaci metabolitů tvořených oxidací vandetanibu byly použity vzorky vandetanibu inkubované s jaterními mikrosomy potkana premedikovaného PCN (kapitola 3.3.1), u kterých vznikají metabolity tohoto léčiva v největším zastoupení. V průběhu oxidace vandetanibu těmito mikrosomy byly pomocí HPLC separovány tři "píky" sloučenin eluované při 5.0 minutách, 5.5 minut a 9.8 minut (Obr. č. 11). Frakce obsahující tyto sloučeniny (vandetanib a jeho jednotlivé metabolity) byly analyzovány pomocí hmotnostní analýsy (kapitola 3.3.6.) .



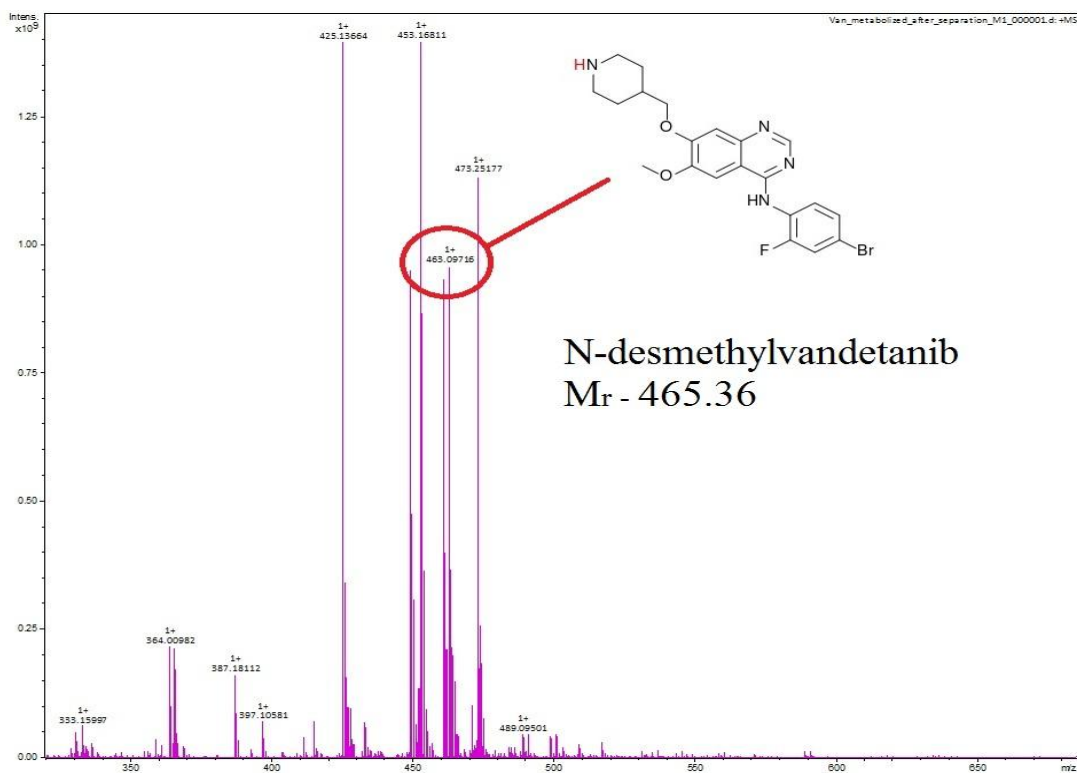
Obrázek č. 11- HPLC reakční směsi sledující oxidaci vandetanibu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (PCN-MS). Složení inkubační směsi viz kapitola 3.3.1, experimentální podmínky HPLC viz kapitola 3.3.5.

4.1.2 Identifikace metabolitů vandetanibu pomocí hmotnostní spektrometrie

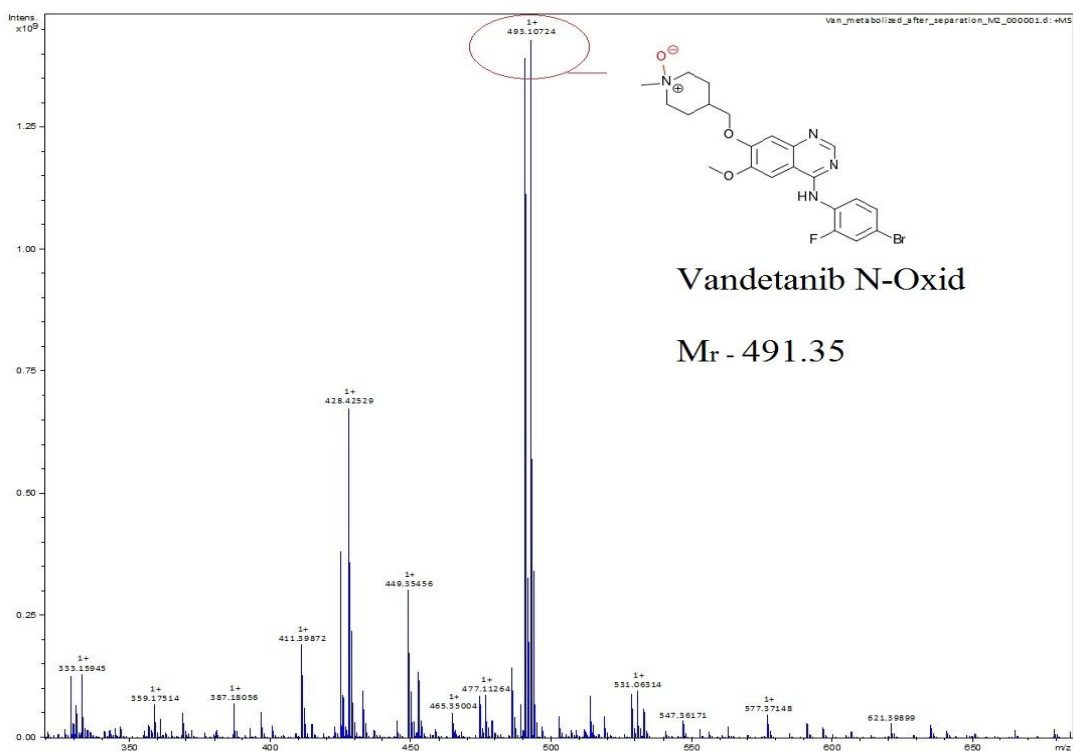
K identifikaci metabolitů vandetanibu (kapitola 3.3.6 a 4.5) byla použita hmotnostní spektrometrie ESI/FT-ICR. Na základě hmotnostní analýsy byla sloučenina eluovaná v chromatogramu (obrázek č. 11) v čase 5.8 min. jako vandetanib (obrázek č. 12), sloučenina eluovaná v čase 5.0 min. jako N-desmethylvandetanib (obrázek č. 13) a látka eluovaná v čase 9.8 min. jako vandetanib N-oxid (obrázek č. 14).



Obrázek č. 12- Identifikace vandetanibu metodou pozitivní ESI-FTICR



Obrázek č. 13- Identifikace N-desmethylvandetanibu metodou pozitivní ESI-FTICR



Obrázek č. 14- Identifikace vandetanib N-oxidu metodou pozitivní ESI-FTICR

4.1.3 Oxidace vandetanibu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných induktory cytochromů P450

Pro určení, které cytochromy P450 se účastní biotransformace vandetanibu, byly použity jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných induktory různých CYP a mikrosomy nepremedikovaných zvířat (kontrolní mikrosomy). Přehled používaných mikrosomálních systémů je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 - Přehled používaných jaterních mikrosomů a jejich induktorů

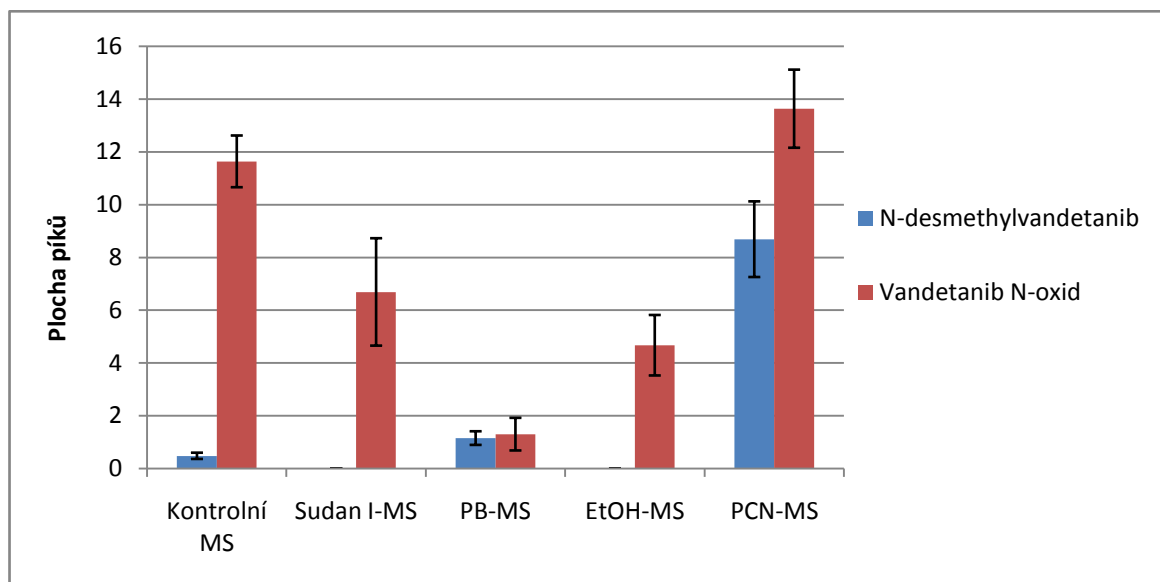
Potkaní mikrosomy	Induktor	Indukovaný cytochrom P450
Kontrolní MS	-	-
Sudan I-MS	Sudan I	CYP1A
EtOH -MS	ethanol	CYP2E1
PB-MS	fenobarbitalem	CYP2B/C
PCN-MS	pregnenolonkarbonitrilem	CYP3A

Kontrolní MS- mikrosomy izolované z jater nepremedikovaných potkanů, Sudan I-MS- mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných Sudanem I, EtOH-MS- mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných ethanolem, PB-MS mikrosomy izolované z jater potkanů fenobarbitalem, PCN-MS- mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem

Pomocí RP-HPLC bylo stanoveno množství vznikajících metabolitů, dle ploch "píků" odpovídajících daným metabolitům.

Již dříve bylo v pracích Martina a jeho spolupracovníků [2011] předpokládáno, že mezi hlavní biotransformační enzymy zodpovědné za biotransformaci vandetanibu, patří CYP3A4, přeměňující vandetanib na N-demethylvandetanib, a flavinmonooxygenasy, biotransformující parentální molekulu vandetanibu na vandetanib N-oxid [Martin et al, 2011]. Tyto předpoklady však nebyly v práci této skupiny jednoznačně potvrzeny.

V diplomové práci jsme sledovali schopnost jednotlivých jaterních mikrosomálních systémů potkanů "nabohacených" různými cytochromy P450 katalyzovat oxidaci vandetanibu. Metabolity N-desmethylvandetanib a vandetanib N-oxid byly separovány pomocí HPLC (viz. kapitola 3.3.5).



Obrázek č. 15- Oxidace vandetanibu potkaními jaterními mikrosomálními systémy. Výsledky jsou uvedeny jako průměry a standardní odchylky ze tří měření.

Jak je ukázáno na obrázku č. 15, mikrosomy izolované z jater potkanů, premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (PCN mikrosomy), přeměňují parentální molekulu vandetanibu na N-desmethylvandetanib a vandetanib N-oxid, s převahou tvorby vandetanib N-oxidu.

N-desmethylvandetanib je tvořen jaterními mikrosomy nepremedikovaných potkanů v mnohem menším množství než mikrosomy potkana premedikovaného PCN. Mikrosomy z jater potkanů, premedikovaných fenobarbitalem, tvoří N-desmethylvandetanib ve větší míře než kontrolní mikrosomy, tvoří však pouze malé množství vandetanib N-oxidu.

Všechny testované jaterní mikrosomální systémy oxidují vandetanib na vandetanib N-oxid. V největší míře tento metabolit vznikl v systému PCN mikrosomů a mikrosomů izolovaných z jater kontrolních zvířat. Vandetanib N-oxid je produkován také jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I, ethanolem a v malé míře systémem jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných fenobarbitalem.

Získané výsledky signalizují, že vandetanib je v jaterních potkaních mikrosomech oxidován několika cytochromy P450. N-desmethylvandetanib je tvořen nejefektivněji CYP podrodiny 3A a v nižší míře též CYP2B. V případě vandetanib N-oxidu odpovídá jeho tvorba cytochromům P450 podrodiny 3A, 2C, 1A a 2E1. Nepatrné množství tohoto metabolitu mohou být přičítány též aktivitě CYP2B.

4.2 OXIDACE VANDETANIBU JATERNÍMI MIKROSOMY ČLOVĚKA

V další části diplomové práce jsme sledovali oxidaci vandetanibu lidskými jaterními mikrosomy. Lidské jaterní mikrosomy byly v oxidaci vandetanibu neúčinné.

4.3 OXIDACE VANDETANIBU POTKANÍMI A LIDSKÝMI REKOMBINANTNÍMI CYTOCHROMY P450 V SUPERSOMECHTM

Na základě výsledků z experimentů sledujících oxidaci vandetanibu jaterními mikrosomy nepremedikovaných potkanů a potkanů, premedikovaných různými induktory cytochromů P450 (kapitola 4.1.3), lze usuzovat, že za metabolismus vandetanibu zodpovídá více forem CYP.

Cílem této části práce proto bylo potvrzení participace výše uvedených isoform potkaních CYP na oxidaci vandetanibu a určení lidských CYP, které oxidaci vandetanibu způsobují. K těmto experimentům byly použity rekombinantní enzymy exprimované v SupersomechTM.

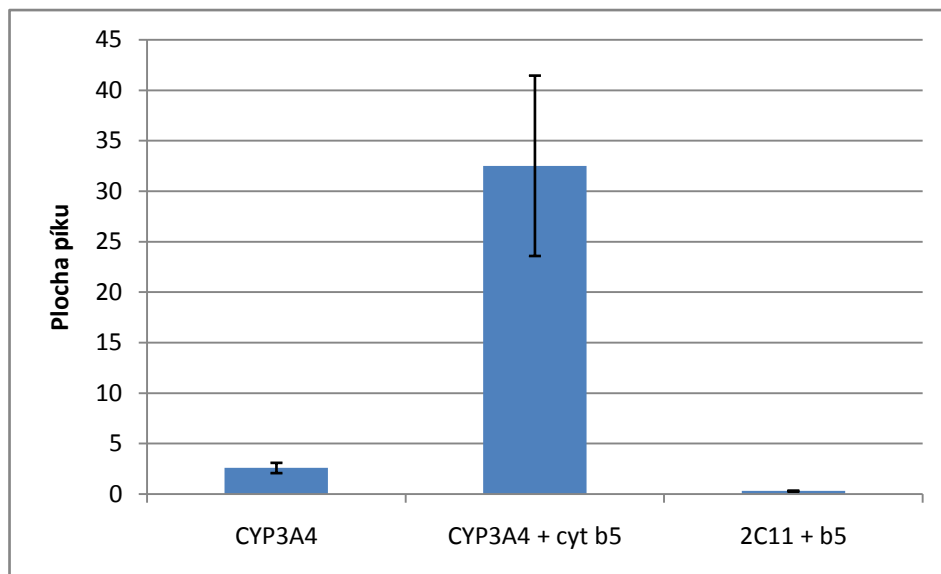
Užity byly systémy exprimující jednotlivé cytochromy P450 spolu s NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CPR), případně i s cytochromem b₅. Testované jaterní rekombinantní cytochromy P450 jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5- Potkaní a lidské rekombinantní cytochromy P450 (SupersomyTM) užívané k analýze jejich aktivity oxidovat vandetanib

Lidské CYP	Potkaní CYP
CYP1A1	CYP1A1
CYP1A2	CYP1A2
CYP1B1	CYP2A2 + cyt b ₅
CYP2A6	CYP2A2 + cyt b ₅
CYP2A6 + cyt b ₅	CYP2B1 + cyt b ₅
CYP2B6	CYP2C6 + cyt b ₅
CYP2B6 + cyt b ₅	CYP2C11 + cyt b ₅
CYP2C8	CYP2C12 + cyt b ₅
CYP2C8 + cyt b ₅	CYP2C13 + cyt b ₅
CYP2C9	CYP2D1
CYP2C9 + cyt b ₅	CYP2D2
CYP2C18	CYP2E1 + cyt b ₅
CYP2C19	CYP3A1 + cyt b ₅
CYP2C19 + cyt b ₅	CYP3A2 + cyt b ₅
CYP2D6	
CYP2E1 + cyt b ₅	
CYP3A4	
CYP3A4 + cyt b ₅	
CYP3A5	
CYP3A5 + cyt b ₅	
CYP3A7 + cyt b ₅	

Z testovaných potkaních cytochromů P450 byl v oxidaci vandetanibu aktivní jenom CYP2C11, a to pouze za přítomnosti cytochromu b₅. Detekována byla tvorba N-desmethylvandetanibu (obr. 16). Tento výsledek odpovídá i výsledkům získaným v experimentech s jaterními potkaními mikrosomy (obr. 15). Mikrosomy z jater potkanů bez premedikace, které CYP2C11 exprimují ve velké míře, tvoří tento metabolit také ve vysoké míře. Vandetanib N-oxid není tvořen žádným z potkaních cytochromů P450.

Ze všech použitých lidských rekombinantních cytochromů P450 byl v oxidaci vandetanibu na N-desmethylvandetanib efektivní pouze cytochrom P450 3A4. Účinnost tohoto cytochromu P450 byla navíc výrazně zvýšena přítomností cytochromu b₅ (obr. 16).



Obrázek č. 16- Oxidace vandetanibu na N-desmethylvandetanib rekombinantními cytochromy P450. Výsledky jsou uvedeny jako průměry a standardní odchylky ze tří měření.

Získané výsledky, tedy poznání, že N-desmethylvandetanib je tvořen pouze potkaním CYP2C11, jsou poněkud překvapující. Z experimentů za použití potkaních jaterních mikrosomů je totiž zřejmé, že by na tvorbě tohoto metabolitu měly participovat i CYP podrodiny 3A. Jejich indukci pregnenolonkarbonitrilem byla oxidace vandetanibu výrazně zvýšena. O důvodu této skutečnosti můžeme však zatím pouze spekulovat. Zda-li zvýšení oxidace vandetanibu na N-desmethylvandetanib v PCN mikrosomech může být způsobeno kombinací různých CYP v těchto mikrosomech bude předmětem dalších výzkumů.

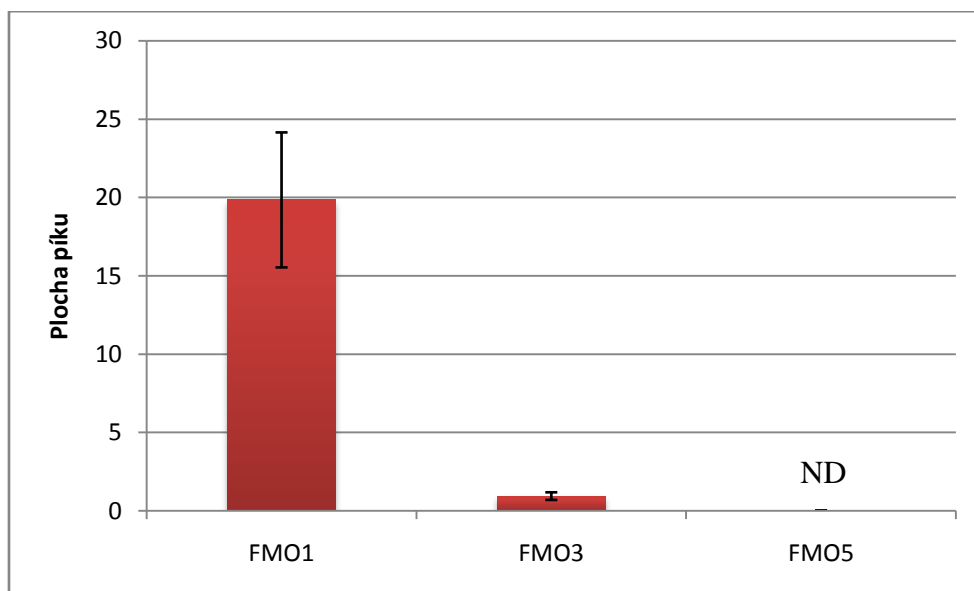
Zjištění, že žádný z testovaných potkaních cytochromů P450 neoxiduje vandetanib na vandetanib N-oxid, i když tvorba tohoto metabolitu byla v jaterních mikrosomech jednoznačně prokázána (obr. 15), napovídají tomu, že jeho tvorba je katalyzována mikrosomálními enzymy jinými, než jsou cytochromy P450. Lze předpokládat, že těmito enzymy mohou být flavinové monooxygenasy. V další části práce byla tedy studována efektivita flavinových monooxygenas v oxidaci vandetanibu. K dispozici však byly pouze lidské flavinmonooxygenasy. Výsledky získané za použití těchto enzymů jsou uvedeny v následující kapitole diplomové práce.

4.4 OXIDACE VANDETANIBU LIDSKÝMI FLAVINMOOXYGENASAMI

Z důvodů uvedených v kapitole 4.3 byla v dalších experimentech sledována oxidace vandetanibu flavinovými monooxygenasami. Navíc, jak již bylo zmíněno výše, v předchozích studiích Martina se spolupracovníky [2011] bylo předpovězeno, že systém lidských jaterních flavinových monooxygenas oxiduje vandetanib, a to za tvorby vandetanib N-oxidu [Martin et al, 2011].

Proto jsme se v další části diplomové práce zaměřili na poznání, jestli jsou tyto enzymy v oxidaci vandetanibu skutečně aktivní, a které z lidských flavinmonooxygenas jsou za přeměnu vandetanibu, konkrétně na vandetanib N-oxid, zodpovědné.

Výsledky uvedené na obr. 17 signalizují, že hlavním flavinmonooxygenasovým systémem zodpovědným za přeměnu vandetanibu na vandetanib N-oxid je FMO1. FMO3 biotransformuje vandetanib přibližně 20x méně efektivněji než FMO1 a v případě FMO5 v oxidaci vandetanibu se tento systém ukázal jako neúčinný. Žádná z použitých lidských flavinových monooxygenas nebyla efektivní ve tvorbě N-desmethylvandetanibu.



Obrázek č. 17- Oxidace vandetanibu na vandetanib N-oxid lidskými flavinovými monooxygenasami 1, 3 a 5. Výsledky jsou uvedeny jako průměry a standardní odchylky ze tří měření.

5. DISKUZE

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšíření poznatků o metabolismu vandetanibu a identifikace enzymů podílejících se na metabolismu tohoto léčiva. Vandetanib je inhibitor tyrosinkinas, který byl v roce 2011 schválený FDA (US Food and Drug Administration) pro léčbu symptomatického nebo progresivního medulárního karcinomu štítné žlázy u pacientů s neoperovatelnou lokálně pokročilou nebo metastázovanou rakovinou štítné žlázy [Giunti et al, 2013].

Předchozí studie předpokládaly, že vandetanib je v lidském organismu přeměňován cytochromem P450 3A4 (CYP3A4) na N-desmethylvandetanib a flavinmonooxygenasovým systémem (FMO1 a FMO3) na vandetanib N-oxid. N-desmethylvandetanib má podobnou farmakologickou účinnost jako parentální molekula, oproti tomu vandetanib N-oxid má 50krát nižší efektivitu než vandetanib, a tím i výrazně sníženou terapeutickou účinnost [Martin et al, 2011]. Studium metabolitů vandetanibu však v dosavadních studiích probíhalo pouze jejich identifikací v séru a v moči pacientů, nikoliv studiemi, které by přesně identifikovaly enzymy, které je tvoří.

V předkládané diplomové práci byly proto hledány enzymy, které se podílejí na biotransformaci vandetanibu na jeho metabolity. K identifikaci daných enzymů bylo použito více přístupů. V experimentech byly používány nejdříve mikrosomální systémy jater potkana. Ty obsahují cytochromy P450, terminální oxidasy MFO systému (systém monooxygenas se smíšenou funkcí) a další komponenty tohoto monooxygenasového systému jako jsou NADPH:CYP reduktasa, NADH:cytochrom b₅ reduktasa a cytochrom b₅. Z dalších enzymů se v jaterních mikrosomech nachází též flavinmonooxygenasy. Vedle tohoto cíle bylo jedním z dalších cílů diplomové práce zjištění, které z cytochromů P450 jsou zodpovědné za oxidaci vandetanibu v lidském organismu a které v organismu potkana.

V první části diplomové práce byla testována schopnost jaterních mikrosomálních systémů potkana biotransformovat vandetanib a identifikace vznikajících metabolitů. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly identifikovány tvořené metabolity jako N-desmethylvandetanib (obr č. 13) a vandetanib N-oxid (obr č. 14).

K určení podrodin cytochromů P450, zodpovědných za oxidaci vandetanibu na jeho metabolity, byly použity mikrosomy potkanů premedikovaných inductory jednotlivých forem cytochromů P450 a nepremedikovaných zvířat (kontrolní mikrosomy). Sledován byl vliv premedikace potkanů Sudanem I (indukce CYP1A), ethanolem (indukce CYP2E1), fenobarbitalem (indukce CYP2B/C) a pregnenolonkarbonitrilem (indukce CYP3A).

Z výsledků experimentů s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrem (PCN mikrosomy), jež je induktorem cytochromů P450 podrodiny 3A, vyplývá, že by za oxidaci vandetanibu na N-desmethylvandetanib v potkaních játrech měl být zodpovědný zejména CYP této podrodiny.

Překvapivý výsledek však byl nalezen při použití potkaních cytochromů P450 3A, kde žádný z testovaných potkaních cytochromů P450 3A (CYP3A1 a CYP3A2) N-desmethylvandetanib netvořil. Vyvětlení těchto rozporných výsledků vyžaduje další hlubší prozkoumání, jež však bylo nad rámec předkládané diplomové práce.

Mikrosomální systémy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP2B/C) a nepremedikovaných (kontrolní) potkanů N-desmethylvandetanib také tvořily, ale v malé míře. Tento metabolit se však v PB mikrosomech a kontrolních mikrosomech nacházel v daleko menším množství, než v PCN mikrosomech. Jak kontrolní, tak PB mikrosomy exprimují vysoký podíl cytochromů P450 podrodiny 2C. V experimentech s jednotlivými potkaními cytochromy P450 tvořily N-desmethylvandetanib pouze CYP2C11. Jelikož nepremedikované potkaní mikrosomy mají přirozeně vysoký obsah cytochromu P450 2C11, z našich experimentů vyplývá, že nezanedbatelnou roli v biotransformaci vandetanibu na N-desmethylvandetanib hraje u potkanů právě tento enzym (CYP2C11). Naopak, z testovaných lidských cytochromů P450 z podrodiny 2C (CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19), ani jeden z enzymů této podrodiny N-desmethylvandetanib netvořil. Také lidský homolog potkaního CYP2C11, cytochrom P450 2C9, nebyl v oxidaci vandetanibu na N-desmethylvandetanib účinný.

Z použitých lidských cytochromů P450 3A (CYP3A4, CYP3A5 a CYP3A7) tvořil tento metabolit pouze CYP3A4. Uvedený výsledek potvrzuje předpoklady Martina a spolupracovníků, že hlavním lidským cytochromem P450 tvořícím N-desmethylvandetanib, je CYP3A4 [Martin et al, 2011].

Unikátní je dosud dříve nepublikované zjištění, jak významnou roli hraje v metabolismu vandetanibu cytochrom b₅. V experimentech testujících jednotlivé cytochromy P450 byly použity v případě CYP3A4 SupersomyTM, obsahující vedle CYP3A4 koexprimovaného s NADPH:CYP reduktasou (CRP) také cytochrom b₅. Efektivita tohoto systému pak byla porovnána s účinností SupersomůTM s exprimovaným CYP3A4, CRP, ale bez cytochromu b₅. Použité SupersomyTM, obsahující CYP3A4, CRP a cytochrom b₅, tvořily N-desmethylvandetanib přibližně v 10krát větším množství než SupersomyTM obsahující pouze CYP3A4 s CRP. Naše výsledky tedy naznačují, že při biotransformaci vandetanibu na N-desmethylvandetanib hraje přítomnost cytochromu b₅ významnou roli. Je pravděpodobné,

že cytochrom b_5 slouží jako donor druhého elektronu v první fázi biotransformace a tímto mechanismem také stimuluje produkci uvedeného metabolitu.

Jaterní potkaní mikrosomy oxidují vandetanib rovněž na vandetanib N-oxid. V největší míře vznikal vandetanib N-oxid oxidací PCN-mikrosomy a mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. V menších množstvích byl nalezen v mikrosomech jater potkanů premedikovaných Sudanem I, ethanolem a nejméně fenobarbitalem. Tento metabolit však není tvořen žádným z testovaných potkaních cytochromů P450. Výsledky získané z těchto experimentů naznačují, že v těchto mikrosomech jsou za tvorbu vandetanib N-oxidu zodpovědné jiné enzymy než cytochromy P450. Lze předpokládat, že těmito enzymy by mohly být flavinmonooxygenasy. V laboratoři, kde byla diplomová práce vypracovávána však potkaní flavinmonooxygenasy, na rozdíl od těchto monooxygenas lidských, k dispozici nebyly. Jejich participace na oxidaci vandetanibu na jeho N-oxid bude předmětem dalších výzkumů.

Dalším cílem práce bylo zjistit, v jaké míře se účastní biotransformace vandetanibu, konkrétně na vandetanib N-oxid jednotlivé lidské jaterní flavinmonooxygenasy. Při pokusech s jednotlivými lidskými flavinmonooxygenasami byl vandetanib oxidován v největší míře na vandetanib N-oxid FMO1. Přibližně ve 20krát menším množství vznikal tento oxidační produkt oxidací katalyzovanou FMO3. FMO5 byl v oxidaci vandetanibu neúčinný. Tyto výsledky korespondují s předpoklady Martina a spolupracovníků [2011], že na oxidaci vandetanibu pomocí flavinmonooxygenas se podílí pouze FMO1 a FMO3 [Martin et al, 2011]. Výsledky dále naznačují, že FMO je pravděpodobně ve všech testovaných potkaních jaterních mikrosomech různě aktivní, což rezultuje ve vznik různého množství vandetanib N-oxidu.

6. ZÁVĚR

Výsledky předkládané v diplomové práci ilustrují, že cíle diplomové práce byly splněny.

V práci byly zjištěny následující poznatky:

- Vandetanib je přeměňován jaterním mikrosomálním systémem potkana na jeho metabolity N-desmethylvandetanib a vandetanib N-oxid.
- N-desmethylvandetanib byl tvořen v největší míře jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (PCN mikrosomy), jež je induktorem podrodiny cytochromů P450 3A.
- N-desmethylvandetanib byl v menší míře tvořen mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP2B/C) a mikrosomy nepremedikovaných potkanů.
- Z lidských cytochromů P450 tvoří N-desmethylvandetanib pouze CYP3A4. Vandetanib N-oxid nebyl detekován jako produkt oxidace vandetanibu katalyzované žádným z testovaných lidských cytochromů P450 exprimovaných v SupersomechTM.
- N-desmethylvandetanib je tvořen potkaním CYP2C11 a dalšími jaterními dosud neidentifikovanými enzymy. Vandetanib N-oxid nebyl detekován jako produkt oxidace vandetanibu žádným z testovaných potkaních cytochromů P450 exprimovaných v SupersomechTM.
- N-desmethylvandetanib je tvořen lidským CYP3A4, a to za přítomnosti nejen tohoto enzymu a NADPH:CYP reduktasy (CRP), ale zejména za přítomnosti cytochromu b₅. Za přítomnosti cytochromu b₅ je tvořen v 10krát větším množství než CYP3A4 bez tohoto proteinu. Tento poznatek naznačuje velký význam cytochromu b₅ pro oxidaci vandetanibu.

- Vandetanib N-oxid je generován v největší míře oxidací vandetanibu PCN-mikrosomy a mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. V menších množstvích byl nalezen i v mikrosomech jater potkanů premedikovaných Sudanem I, ethanolem a nejméně fenobarbitalem. Výsledky naznačují, že FMO, které mohou být za jeho tvorbu v těchto mikrosomech zodpovědné, jsou ve všech testovaných potkaních jaterních mikrosomech různě aktivní. To výsledně způsobuje tvorbu proměnlivého množství vandetanib N-oxidu.
- V experimentech využívajících lidské flavinmooxygenasy byl tvořen pouze vandetanib N-oxid. Vandetanib N-oxid byl tvořen v největší míře FMO1 a v menším množství i FMO3. FMO5 byl v oxidaci vandetanibu neúčinný.

Seznam použité literatury

Artigas, C. G., Melo, A., Roa, J. C., Paez, E., Vittini, C., Arriagada, M., González, L., Pflaumer, E. & Roa, I. (2002). Detection of BCR-ABL gene sequences using RT-PCR in patients with leukemia in the IX region. Chile. *Revista Medica de Chile* 130, 623-630.

Bendlová B., Dvořáková Š., Václavíková E. & Vlček, P. (2009) Mnohočetná endokrinní neoplazie typ 2 – syndrom MEN 2, *Klinická Onkologie* 22, 28–31.

Dunne-Daly, C. F. (1999). Principles of radiotherapy and radiobiology. *Seminars in Oncology Nursing* 15, 250-259.

Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N. & Cervantes, F. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 355, 2408-2417.

Elisei, R., Schlumberger, M. J., Müller, S. P., Schöffski, P., Brose, M. S., Shah, M. H. & Niederle, B. (2013). Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology* 31, 3639-3646.

Erovc, B. M., Kim, D., Cassol, C., Goldstein, D. P., Irish, J. C., Asa, S. L., & Mete, O. (2012). Prognostic and predictive markers in medullary thyroid carcinoma. *Endocrine pathology* 23, 232-242.

Eswaramoorthy, S., Bonanno, J. B., Burley, S. K., & Swaminathan, S. (2006). Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9832-9837.

Fernando, J., & Jones, R. (2015). The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)* 33, 131-135.

Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., & Reis-Henriques, M. A. (2006). The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. *Marine Environmental Research* 61, 326-338.

Giunti, S., Antonelli, A., Amorosi, A., & Santarpia, L. (2013). Cellular signaling pathway alterations and potential targeted therapies for medullary thyroid carcinoma. *International Journal of Endocrinology*.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Harris, C. C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Research* 51, 5023-5044

Hernandez, D., Janmohamed, A., Chandan, P., Phillips, I. R., & Shephard, E. A. (2004). Organization and evolution of the flavin-containing monooxygenase genes of human and mouse: identification of novel gene and pseudogene clusters. *Pharmacogenetics and Genomics* 14, 117-130.

Hundahl, S. A., Fleming, I. D., Fremgen, A. M., & Menck, H. R. (1998). A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985-1995. *Cancer* 83, 2638-2648.

Chanda, S., Dasgupta, U. B., GuhaMazumder, D., Gupta, M., Chaudhuri, U., Lahiri, S., Subhankar, D., Nilima, G. & Chatterjee, D. (2006). DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicological Sciences* 89, 431-437.

Schlumberger, M. J., & Pacini, F. (2004). Anaplastic thyroid carcinoma. *Orphanet Encyclopedia* 3, 1-3.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 66, 7-30.

Krause, D. S., & Van Etten, R. A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine* 353, 172-187.

Kot, M., & Daniel, W. A. (2007). Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacological Reports* 59, 296.

Koukouritaki, S. B., Simpson, P., Yeung, C. K., Rettie, A. E., & Hines, R. N. (2002). Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression. *Pediatric Research* 51, 236-243.

Janice, G. (2007). *The Biology of Cancer*, 2nd Edition, John Wiley & Sons

Levi, P. E. (2010). *A Textbook of Modern Toxicology*, 3rd Edition, John Wiley & Sons

Levitzki, A. (2013). Tyrosine kinase inhibitors: views of selectivity, sensitivity, and clinical performance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53, 161-185.

Linder, M. W., Prough, R. A., & Valdes, R. (1997). Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clinical Chemistry* 43, 254-266.

Límanová, Z. (2003). Nádory štítné žlázy - diagnostika a léčba, *Interní Medicína* 6, 308-314

Lippert, B. (1999). *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. John Wiley & Sons.

Lind, M. J. (2008). Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine* 36, 19-23.

Luster, M., Clarke, S. E., Dietlein, M., Lassmann, M., Lind, P., Oyen, W. J. G., Tennvall, J. & Bombardieri, E. (2008). Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 35, 1941-1959.

Olivier, M., Hussain, S. P., Caron, D. F. C., Hainaut, P., & Harris, C. C. (2003). TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Scientific Publications* 157, 247-270

Martin, P., Oliver, S., Robertson, J., Kennedy, S. J., Read, J., & Duvauchelle, T. (2011). Pharmacokinetic drug interactions with vandetanib during coadministration with rifampicin or itraconazole. *Drugs in R & D* 11, 37-51.

Meunier, B., De Visser, S. P., & Shaik, S. (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews* 104, 3947-3980.

Nix, P., Nicolaides, A., & Coatesworth, A. P. (2005). Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer. *International Journal of Clinical Practice* 59, 1340-1344.

Nix, P., Nicolaides, A., & Coatesworth, A. P. (2005). Thyroid cancer review 2: management of differentiated thyroid cancers. *International Journal of Clinical Practice* 59, 1459-1463.

Nix, P. A., Nicolaides, A., & Coatesworth, A. P. (2006). Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer. *International Journal of Clinical Practice* 60, 80-84.

Papac, R. J. (2001). Origins of cancer therapy. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 74, 391.

Parkinson, A. (2001). *Biotransformation of Xenobiotics*, McGraw-Hill

Peterson, D. E., Elias, E. G., & Sonis, S. T. (2012). *Head and Neck Management of the Cancer Patient*, Springer Science & Business Media.

Ponder, B. A. (2001). Cancer genetics. *Nature* 411, 336-341.

Puyo, S., Montaudon, D., & Pourquier, P. (2014). From old alkylating agents to new minor groove binders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 89, 43-61.

Rang, H. P., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2007). *Rang & Dale's Pharmacology*: 5th edn, Churchill Livingstone.

Rosypal, S. (1999). *Úvod do molekulární biologie, druhý díl (molekulární biologie eukaryot)*, 3rd edition, [Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta]

Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*, 4th Edition, Oxford University Press.

Shchemelinin, I., Sefc, L., & Necas, E. (2006). Protein kinase inhibitors. *Folia Biologica* 52, 137.

Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., & Hradec, J. (1990). Mechanism of formation and ³²P-postlabeling of DNA adducts derived from peroxidative activation of carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I). *Carcinogenesis* 11, 1843-1848.

Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V., & Páca JR, J. (2004). Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické Listy* 98, 876-890.

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science & Therapy* 1, 1.

Varricchio, C. G. (2004). *A Cancer Source Book for Nurses*, 8th Edition, Jones & Bartlett Learning.

Varmus, H. E. (1985). Alfred P. Sloan prize. Viruses, genes, and cancer. I. The discovery of cellular oncogenes and their role in neoplasia. *Cancer* 55, 2324-2328.

Vermes, A., Guchelaar, H. J., & Koopmans, R. P. (1997). Individualization of cancer therapy based on cytochrome P450 polymorphism: a pharmacogenetic approach. *Cancer Treatment Reviews* 23, 321-339.

Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.

Weinberg, R. (2013). *The Biology of Cancer*, 2nd Edition, Garland science.

Wells, S. A., Robinson, B. G., Gagel, R. F., Dralle, H., Fagin, J. A., Santoro, M., Elisei, R. & Read, J. (2012). Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *Journal of Clinical Oncology* 30, 134-141.

Wells, S. A., Gosnell, J. E., Gagel, R. F., Moley, J., Pfister, D., Sosa, J. A., Skinner, M., Krebs A., Vasselli, J. & Schlumberger, M. (2010). Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 767-772.

Yoshimoto, M., Kurihara, H., & Fujii, H. (2015). Theragnostic imaging using radiolabeled antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *The Scientific World Journal* 2015.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů

Jména a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka